



# Imagerie quantitative du dépôt d'aérosols dans les voies aériennes du petit animal par résonance magnétique

Hongchen Wang

## ► To cite this version:

Hongchen Wang. Imagerie quantitative du dépôt d'aérosols dans les voies aériennes du petit animal par résonance magnétique. Physique Médicale [physics.med-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112034 . tel-01168711

**HAL Id: tel-01168711**

**<https://theses.hal.science/tel-01168711>**

Submitted on 26 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



## UNIVERSITÉ PARIS-SUD

### ÉCOLE DOCTORALE 422 SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'INFORMATION DES TÉLÉCOMMUNICATIONS ET DES SYSTÈMES

Thèse préparée au sein du laboratoire d'Imagerie par Résonance Magnétique Médicale et  
Multi-Modalités (IR4M), UMR 8081, CNRS – Université Paris-Sud

**DISCIPLINE : PHYSIQUE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

**par**

**Hongchen WANG**

## **IMAGERIE QUANTITATIVE DU DEPÔT D'AÉROSOLS DANS LES VOIES AÉRIENNES DU PETIT ANIMAL PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE**

**Date de soutenance : 13 mars 2015**

**Composition du jury :**

*Directeur de thèse*  
*Rapporteurs*

Dr Ludovic DE ROCHEFORT  
Dr Yannick CREMILLIEUX  
Pr Hervé SAINT-JALMES  
Dr Marcel FILOCHE  
Pr Philippe GRENIER  
Dr Ira KATZ

IR4M, Université Paris-Sud  
CRMSB, Université Bordeaux  
LTSI, INSERM U1099, Université Rennes 1  
PMC, Ecole Polytechnique  
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Paris 6  
CRCI, Air Liquide Santé International

*Examineurs*



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®

*Thèse réalisé au* Imagerie par Résonance Magnétique Médicale et Multi-Modalités  
IR4M, CNRS – Université Paris-Sud (UMR 8081)  
Bâtiment 220  
91405 Orsay cedex  
France

Tél. +33 1 69 15 79 65  
Fax. +33 1 69 15 41 36

Page web : <http://www.ir4m.u-psud.fr/>

*Sous la direction de* Ludovic de Rochefort      ludovic.de-rochefort@u-psud.fr

*Financement*      Projet OxHelease (ANR-11-TecSan-006-02)

*Contact personnel*      Hongchen Wang      hongchen.wang@u-psud.fr

---



# Résumé

Cette thèse s'inscrit dans le projet OxHelease (ANR-TecSan 2011) qui vise à étudier l'impact de l'inhalation de l'hélium-oxygène sur la ventilation, l'oxygénation sanguine, le dépôt d'aérosol dans l'asthme et l'emphysème. Dans ce cadre, ce travail de thèse a consisté à mettre au point des méthodes d'imagerie par résonance magnétique pour quantifier les dépôts d'aérosols chez le rat.

L'administration de médicaments par voie inhalée est une approche possible pour le traitement des maladies pulmonaires comme les broncho-pneumopathies chroniques obstructives. C'est également une voie intéressante pour l'administration systémique de médicaments en raison d'un transfert potentiellement rapide dans le sang. Néanmoins, le transport et les dépôts de particules dans les poumons sont complexes et difficiles à prédire, à cause de la dépendance de nombreux paramètres, tels que le protocole d'administration, la morphologie des voies aériennes, le profil respiratoire, ou encore les propriétés aérodynamiques du gaz et des particules. Pour mieux maîtriser cette voie d'administration de médicaments, des outils d'imagerie peuvent être utilisés. L'IRM est moins conventionnelle que d'autres approches pour caractériser le poumon, mais les progrès techniques et les multiples mécanismes de contraste exploitables peuvent être mis à profit pour ce faire.

Pour obtenir un signal exploitable du parenchyme pulmonaire chez le rat, une séquence IRM à temps d'écho court a été mise en place sur un système clinique à 1,5 T. Cette technique a été combinée à une administration de courte durée d'un aérosol de chélate de Gadolinium en respiration spontanée. Le mécanisme de contraste principal utilisé est la modification du temps de relaxation longitudinale induisant un rehaussement du signal et qui permet d'estimer la concentration locale avec une résolution spatiale de  $(0,5 \text{ mm})^3$  et temporelle de 7,5 min permettant également de suivre l'élimination pulmonaire au cours du temps. La sensibilité de cette approche (seuil de détection de l'ordre de  $20 \mu\text{M}$ ) a été déterminée et pour cela des méthodes d'analyses spécifiques globales et locales incluant des segmentations, des analyses de distributions et des statistiques ont été développées. Après validation sur des rats sains, pour lesquels un rehaussement moyen de 50%, une distribution homogène de dépôt et une dose totale relativement faible ( $\sim 1 \mu\text{mol/kg}$  de poids corporel) ont été observés, cette modalité d'imagerie a pu être appliquée chez des modèles asthmatiques et emphysemateux qui ont montrés des différences significatives de certains paramètres comme l'homogénéité des dépôts ou la cinétique d'élimination. Par ailleurs, des résultats préliminaires de mise en place d'une étude multimodale, où l'IRM est comparée à la tomodensitométrie et à l'imagerie nucléaire sur les mêmes animaux a été effectuée. Enfin, dans une optique d'évaluation de la faisabilité d'approches quantitatives par IRM, un système double noyaux proton-fluor pour déterminer la sensibilité de l'imagerie de gaz et d'aérosols fluorés a été implémenté et testé sur des rats.

Ces approches par IRM ouvrent des perspectives pour permettre la caractérisation *in vivo* des dépôts de particules inhalées dans des conditions d'administration variées et leur sensibilité suggère un transfert potentiel chez l'homme.

**Mots clés :** IRM pulmonaire; Temps d'écho ultra-court; Agent de contraste; Relaxation  $T_1$ ; Imagerie quantitative ; Nébulisation ; Dépôt d'aérosol; Asthme ; Emphysème ; Rat



# **Quantitative imaging of aerosol deposition in small animal airways using magnetic resonance imaging**



# Abstract

This PhD thesis is part of the OxHelease project (ANR-TecSan 2011) that aims to study the impact of helium-oxygen inhalation on ventilation, blood oxygenation, and aerosol deposition in chronic obstructive respiratory diseases, such as asthma and emphysema. In this context, this work consisted of developing magnetic resonance imaging methods to quantify aerosol deposition in rat lungs.

The inhalation of pharmaceutical aerosols is an attractive approach for the treatment of lung diseases such as chronic obstructive pulmonary diseases. This is also an interesting route for the treatment of systemic disorders with the potentially fast drug transfer into circulation. However, the transport and the deposition of particles within the lungs are complex and difficult to predict, since deposition patterns depend on a number of parameters, such as administration protocols, airway geometries, inhalation patterns, and gas and aerosol aerodynamic properties. Thus, the understanding of drug delivery through the lungs is improved by imaging methods that quantify regional particle deposition. Magnetic Resonance Imaging (MRI) is less conventional than other approaches for lung characterization, but the technical advances and the multiple contrast mechanisms render lung imaging more feasible.

To obtain an exploitable signal from the lung parenchyma of the rat, an ultra-short echo (UTE) sequence was implemented on a 1.5 T clinical system. This technique was combined with a Gadolinium-based aerosol nebulization of short duration in spontaneously breathing rats. The main contrast mechanism used here is the modification of the longitudinal relaxation time yielding signal enhancement and allowing for the assessment of the local concentration with a spatial resolution of  $(0.5 \text{ mm})^3$  and a temporal resolution of 7.5 min enabling the quantification of lung clearance. The sensitivity of this approach (with a detection limit close to  $20 \mu\text{M}$ ) was determined. To do so several specific processing methods were developed for local and total lung evaluation, including segmentation, distribution analysis and statistics. After validation in healthy rats, for which a signal enhancement of 50% on average, a homogenous distribution of deposition and a relatively low total deposited dose ( $\sim 1 \mu\text{mol/kg}$  body weight) were observed, this imaging modality could be applied in asthmatic and emphysematous animal models. Significant differences were obtained such as homogeneity of deposition or clearance. Moreover, preliminary results of a multimodal study, in which MRI was compared with computed tomography and with nuclear medicine imaging in the same animals, were obtained. Finally, in order to evaluate the feasibility of other potential quantitative MRI approaches, a dual-nuclei proton/fluorine system was implemented and tested in rats for determining the sensitivity of fluorine-based gas and aerosol imaging.

These MRI strategies may be applied for the *in vivo* characterization of particle deposition inhaled under variable administration conditions. Their sensitivity suggests a feasible translation to humans.

**Keywords:** Lung MRI; Ultra-Short Echo; Contrast agent;  $T_1$  Relaxation; Quantitative imaging ; Nebulization ; Aerosol deposition ; Asthma ; Emphysema ; Rat.



# Remerciements

Ce manuscrit présente l'aboutissement d'un travail de trois ans et trois mois, qui s'est déroulé à l'Imagerie par Résonance Magnétique Médicale et Multi-Modalités (IR4M), unité mixte de recherche (UMR 8081) du CNRS et de l'Université Paris-Sud. Ce travail a été financé par la société Air Liquide dans le cadre du projet OxHelease du programme des technologies pour la santé de l'agence nationale de la recherche (ANR-TecSan 2011). Ce projet pluridisciplinaire de physique-médecine-biomécanique, associant des collaborateurs variés, m'a permis d'acquérir des compétences de recherche, théorique et méthodologique. J'ai pu bénéficier d'un grand soutien dans le laboratoire aussi bien qu'avec des équipes collaboratrices, d'un point de vue scientifique et personnel. J'ai beaucoup apprécié cet environnement et voudrais adresser mes remerciements.

C'est en avril 2010 que j'ai fait mon premier pas vers le vaste domaine de l'IRM, grâce à un stage au sein de l'IR4M sous la direction de Geneviève Guillot. Elle m'a guidé pour me faire découvrir ce domaine intéressant avec sa patience et son extraordinaire savoir.

Etant de nature curieux, j'ai pu continuer mon stage de fin d'étude de Master en 2011, codirigé par Ludovic de Rochefort (IR4M) et Jean-Sébastien Raynaud (Guerbet). Ce travail a confirmé ma motivation pour poursuivre l'aventure en IRM en thèse.

Cette thèse a été dirigée par Ludovic. Je le remercie très chaleureusement pour m'avoir donné le goût de la recherche, pour sa disponibilité à tout moment et pour son soutien fiable. Son efficacité et son dynamisme ont permis d'éclairer les problèmes rencontrés et d'accélérer mon travail, tout au long de ces années d'étude.

Je tiens à remercier Xavier Maître, responsable pour l'IR4M de l'ANR OxHelease, qui a notamment organisé les travaux collaboratifs entre les laboratoires impliqués dans les meilleures conditions et m'a fait confiance pour mener à bien ce projet.

J'adresse mes remerciements à Luc Darrasse pour nos discussions et ses conseils de qualité.

Merci encore à Geneviève, pour sa gentillesse, et sa disponibilité pour partager ses connaissances étendues scientifiques et culturelles.

Je voudrais remercier Catherine Sebrié. Ce travail avait une forte composante préclinique qui n'aurait pas pu être possible sans son aide tout au long des expérimentations animales.

Je remercie également Jean-Pierre Ruaud, pour son œuvre d'art en mécanique.

Je souhaite aussi faire part de ma reconnaissance à tout le laboratoire IR4M pour l'ambiance de travail agréable et les contributions de près ou de loin à ce travail. Je remercie tout particulièrement Georges Willoquet pour son soutien informatique et son talent d'ingénierie électronique, Rose-Marie Dubuisson pour son aide précieuse devant la console d'IRM et au SHFJ, Jean-Christophe Ginefri pour la discussion sur l'antenne RF et ses conseils pour conduire les études doctorales, Marie Poirier-Quinot pour son humour et ses sollicitations pour nous faire sortir de nos bureaux sur le terrain sportif. Merci également à Albine Pinseel pour sa sympathie et son soutien efficace sur les aspects administratifs, ainsi que les pots, les repas de Noël et les décorations associées. Merci à Jacques Bittoun pour son accueil chaleureux dans le Master d'imagerie médicale qui m'a permis d'aller plus loin sur ce chemin. Merci à Mathieu Sarraçanie pour la discussion et les informations sur sa thèse réalisée dans un projet précédent. Merci à Ingrid Leguerney et Sandra Robin pour leur aide sur les expérimentations animales. Merci également à Stephen Randall Thomas pour ses conseils sur l'édition de l'article. Je pense également à Dima Rodriguez, Stéphanie Pitre-Champagnat et Anne Leroy-Willig pour leur gentillesse et les discussions diverses.

Je souhaite également exprimer toute mon amitié à tous thésards accomplis ou en devenir que j'ai pu croisés : Matthias Korn, Nicolas Gargam, Simon Lambert, Chrystelle Po, Pascal Hagot, Marion Tardieu, Maya Khalifé, Pablo Milioni de Carvalho, Bing Zhou, Roberta Kriegl, Chih-Ying Wang, Khaoula Bouazizi-Verdier, Zhoujian Li, Laure Boyer, Hanadi Skeif, Nicholas Bernards et Takoua Kaaouana. Ça a été un grand plaisir de travailler et discuter avec vous, ainsi que de passer des bons moments ensembles, dans le laboratoire, aux conférences ou ailleurs.

En particulier, le travail de développement du système double-résonance (proton-fluor) a été réalisé par Lizheng Qiu, que j'ai encadré en stage de M2 sur six mois. Merci à Lizheng pour son travail sérieux. Le travail applicatif avec ce système a été ensuite réalisé avec l'aide de Maya. Merci également à Maya d'avoir passé tout ce temps pour ces manips et ces analyses.

Je tiens également à remercier Alain Le Pape et toute son équipe du CIPA à Orléans, qui a contribué à réaliser les études multimodales. Merci à Stéphanie Lerondel pour sa disponibilité pour le déroulement des expériences. Merci également à Stéphanie Rétif et Marilyne Le Mée pour leur aide lors des expériences d'imagerie sur modèle. Merci surtout à Julien Sobilo pour les réponses sur les questions spécifiques au sujet de leurs acquisitions d'imagerie.

Les modèles animaux de maladies respiratoires chroniques ont été développés par Sébastien Judé et Anne Maurin du CERB à Baugy. Merci pour la collaboration qui a rendu possible l'application de la méthode IRM chez ces modèles. Merci également pour les renseignements et les conseils donnés au cours de nos échanges.



Je tiens à saisir cette occasion pour remercier Yannick Crémillieux, pour son accueil chaleureux lors du workshop à Bordeaux, dans lequel j'ai beaucoup appris sur l'état de l'art sur l'imagerie pulmonaire. Je le remercie, ainsi que Hervé Saint-Jalmes, pour m'avoir fait l'honneur de rapporter ce travail. Je remercie Ira Katz pour son aide à la caractérisation de l'aérosol, et ses conseils pour les analyser et les interpréter, ainsi que pour avoir accepté de faire partie du jury. Merci également à Marcel Filoche et Philippe Grenier pour avoir accepté de juger ce travail et pour apporter leurs avis d'expert sur les aspects de physique des écoulements et médicaux dans ce travail.

Dans le cadre du projet OxHelease, je souhaite également remercier Caroline Majoral et Georges Caillibotte (Air Liquide) d'avoir piloté le projet, l'équipe de Celine Grandmont (LMO), l'équipe de Laurent Vecellio (INSERM U618), l'équipe de Catalin Fetita (IT/TSP), L'équipe de Lucie Bailly (IRPHE) et l'équipe de l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris (Université Paris 13) pour leurs différents apports en amont de ce travail.

A mes amis, proches ou lointains, pour leur soutien et les nouvelles provenant tous les coins du monde. Merci l'internet.

Je voudrais témoigner toute ma reconnaissance à mes parents, pour leur soutien éternel.

Je tiens bien évidemment à terminer en remerciant Wenjing, pour la joie et la bonne humeur qu'elle m'a apportées, ainsi que son écoute et sa compagnie pour me permettre de traverser les moments difficiles et repartir du bon pied.



# Table des matières

RESUME .....	III
ABSTRACT .....	VII
REMERCIEMENTS .....	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XIII
INTRODUCTION .....	1
<b>CHAPITRE 1. BASE PHYSIQUES DE L'IRM DANS LE CONTEXTE DE L'IMAGERIE PULMONAIRE .....</b>	<b>5</b>
1.1 LE PHENOMENE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.....	5
1.1.1 Aimantation à l'équilibre thermique.....	6
1.1.2 Mise hors équilibre de l'aimantation et retour à l'équilibre.....	8
1.1.3 Antenne radiofréquence et observation du signal RMN .....	9
1.2 LA FORMATION DE L'IMAGE PAR RMN.....	10
1.2.1 Les gradients .....	10
1.2.2 La sélection de coupe .....	11
1.2.3 La lecture.....	12
1.2.4 Le codage de phase .....	13
1.2.5 Le plan de Fourier .....	14
1.2.6 Remplissages cartésien et radial du plan de Fourier .....	14
1.3 ASPECTS QUANTITATIFS DE L'IRM .....	15
1.3.1 Signal, contraste et bruit .....	16
1.3.2 Mécanisme et utilisation de la relaxation .....	18
1.3.3 Relaxométrie .....	21
1.3.4 Susceptibilité magnétique .....	23
1.3.5 Propriétés principales et utilisation des agents de contraste .....	25
1.4 METHODES D'IRM PULMONAIRE.....	27
1.4.1 Propriétés physiques des poumons pour l'IRM.....	27
1.4.2 Imagerie proton du parenchyme.....	28
1.4.3 Imagerie des gaz basée sur d'autres noyaux.....	30
<b>CHAPITRE 2. ELEMENTS SUR LA PHYSIOLOGIE PULMONAIRE ET LES AEROSOLS.....</b>	<b>33</b>
2.1 ELEMENTS SUR LE TRANSPORT DANS LES POUMONS DE RAT .....	33
2.1.1 Le rat Wistar.....	33
2.1.2 Anatomie et fonction des voies aériennes.....	34
2.1.3 L'asthme et l'emphysème, le modèle rat .....	45
2.2 ELEMENTS SUR LES AEROSOLS .....	48
2.2.1 Définition générale.....	48
2.2.2 Caractérisation de la taille des particules d'aérosol .....	48
2.2.3 Nombre de Reynolds.....	53
2.2.4 Mécanisme de dépôt d'aérosol.....	53
2.2.5 Modèle de rat pour l'évaluation du dépôt d'aérosol .....	56
2.2.6 Mécanisme de clairance des particules dans les poumons .....	57
2.2.7 Génération des aérosols.....	59
2.2.8 Modes d'administration des aérosols dans les poumons .....	64
2.3 ETAT DE L'ART DES TECHNIQUES D'IMAGERIE SUR LES DEPOTS D'AEROSOL.....	67
2.3.1 Techniques à base de rayons X.....	67
2.3.2 Médecine nucléaire .....	68
2.3.3 Techniques optiques .....	70
2.3.4 IRM.....	70
2.3.5 Résumé .....	71

<b>CHAPITRE 3. MATERIEL ET METHODE POUR LA QUANTIFICATION DES DEPOTS D'AEROSOL PAR IRM.....</b>	<b>73</b>
3.1 METHODE DE QUANTIFICATION D'AGENTS DE CONTRASTE .....	73
3.1.1 Limite de détection d'agents de contraste via l'amplitude et la phase.....	73
3.1.2 Quantification par $R_1$ .....	83
3.1.3 Effet de $R_2^*$ dans les poumons sur la quantification.....	84
3.2 CARACTERISATION ET MISE EN PLACE DU MATERIEL ET DES METHODES POUR L'IMAGERIE DES DEPOTS D'AEROSOL CHEZ LE RAT .....	87
3.2.1 Caractérisation des aérosols générés par le nébuliseur .....	87
3.2.2 Imageur clinique.....	95
3.2.3 Installation de l'animal dans l'imageur .....	96
3.2.4 Spécificité de la séquence UTE.....	97
3.2.5 Mise en place et caractérisation de l'antenne .....	99
<b>CHAPITRE 4. MISE EN PLACE DE L'IMAGERIE DES DEPOTS D'AEROSOL DE GD-DOTA SUR RATS SAINS.....</b>	<b>111</b>
4.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	111
4.1.1 Modèle de rats sains .....	111
4.1.2 Protocole d'administration .....	111
4.1.3 Protocole IRM.....	111
4.2 ANALYSE DES IMAGES .....	112
4.2.1 Segmentation du poumon.....	112
4.2.2 Analyse des données .....	116
4.2.3 Effet de $R_2^*$ sur la quantification .....	116
4.2.4 Evaluation de la dose administrée.....	116
4.2.5 Distribution des dépôts d'aérosol .....	117
4.2.6 Analyse statistique .....	118
4.3 RESULTATS.....	118
4.3.1 Analyse quantitative in vivo .....	118
4.3.2 Evaluation in vitro de la taille aérodynamique et de la dose administrée.....	120
4.3.3 Mesure de $R_2^*$ et effet de $R_2^*$ sur la quantification .....	120
4.3.4 Rehaussement dans le système cardiovasculaire .....	121
4.3.5 Distribution dans les poumons .....	122
4.3.6 Corrélation entre les paramètres mesurés .....	125
4.4 DISCUSSION .....	126
4.4.1 Synthèse du protocole d'imagerie .....	126
4.4.2 Comparaison avec des études précédentes.....	127
4.4.3 Efficacité de l'administration .....	127
4.4.4 Comparaison avec les autres modes d'administration.....	128
4.4.5 Hypothèse de l'échange rapide .....	128
4.4.6 Distribution régionale du dépôt .....	129
4.4.7 Dépôts localisés.....	129
4.4.8 Elimination pulmonaire et cardiovasculaire .....	130
4.4.9 Effet de $R_2^*$ .....	130
4.4.10 Liens entre quantité de dépôt et paramètres pré-contraste.....	131
4.4.11 Transfert potentiel clinique.....	131
4.5 CONCLUSION .....	132
<b>CHAPITRE 5. MESURE DES DEPOTS PAR IRM SUR MODELES ASTHMATIQUES ET EMPHYSEMATEUX .....</b>	<b>133</b>
5.1 DEVELOPPEMENT DES MODELES ANIMAUX.....	133
5.1.1 Développement et caractérisation des rats asthmatiques .....	133
5.1.2 Développement et caractérisation des rats emphysemateux .....	137
5.2 ADAPTATION DU PROTOCOLE IRM ET DE L'ANALYSE .....	140
5.2.1 Rats asthmatiques.....	140
5.2.2 Rat emphysemateux.....	145
5.2.3 Traitement de données et analyses des résultats.....	146
5.3 RESULTATS SUR LE MODELE ASTHMATIQUE .....	147

5.3.1	Synthèse de mesures .....	147
5.3.2	Intensité de signal .....	149
5.3.3	Profil respiratoire.....	149
5.3.4	Mesure de $R_2^*$ .....	149
5.3.5	Evolution de la cinétique de prise et d'élimination de contraste .....	150
5.3.6	Carte de concentration des dépôts.....	152
5.3.7	Distribution régionale.....	154
5.3.8	Effets de l'asthme sur les dépôts d'aérosol .....	155
5.4	DISCUSSION SUR LE MODELE ASTHMATIQUE .....	159
5.4.1	Intensité de signal, profil respiratoire et effet $R_2^*$ .....	159
5.4.2	Evolution de la cinétique de prise de contraste .....	159
5.4.3	Carte de concentration du dépôt d'aérosol et distribution régionale.....	160
5.4.4	Dispersion et asymétrie des paramètres RMN.....	160
5.4.5	Modification morpho-pathologique de poumon et dépôt d'aérosol .....	161
5.5	RESULTATS SUR LE MODELE EMPHYSEMEATEUX .....	162
5.5.1	Synthèse des aspects quantitatifs .....	162
5.5.2	Intensité du signal .....	163
5.5.3	Profil respiratoire.....	163
5.5.4	Mesure de $R_2^*$ .....	163
5.5.5	Evolution de la cinétique de prise et d'élimination de contraste .....	164
5.5.6	Carte de concentration du dépôt d'aérosol .....	167
5.5.7	Distribution régionale.....	175
5.5.8	Effet de l'emphysème sur les dépôts d'aérosol .....	175
5.6	DISCUSSION SUR LE MODELE EMPHYSEMEATEUX.....	176
5.6.1	Intensité de signal, profil respiratoire et effet $R_2^*$ .....	176
5.6.2	Evolution temporelle de la prise de contraste .....	177
5.6.3	Carte de concentration du dépôt d'aérosol et distribution régionale.....	177
5.6.4	Dispersion de distribution des paramètres RMN.....	178
5.6.5	Modification morpho-pathologique des poumons et dépôt d'aérosol .....	178
5.7	CONCLUSION .....	179
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>181</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>187</b>
A.	IRM DOUBLE RESONANCE 19F-1H POUR ETUDIER L'ADMINISTRATION ET L'ELIMINATION DE PFOC DANS LES POUMONS DE RAT .....	189
B.	RESULTAT PRELIMINAIRE DE MULTI-MODALITES .....	193
<b>TABLE DES SYMBOLES.....</b>		<b>203</b>
<b>TABLE DES ABREVIATIONS .....</b>		<b>207</b>
<b>PUBLICATIONS ASSOCIEES A CE TRAVAIL .....</b>		<b>211</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>213</b>



# Introduction

Cette thèse, effectuée au sein du laboratoire d'Imagerie par Résonance Magnétique Médicale et Multi-Modalités (IR4M), UMR 8081 Université Paris Sud-CNRS, s'inscrit dans le projet OxHelease (ANR-TecSan 2011), piloté par la société Air Liquide et impliquant sept autres laboratoires partenaires : le Centre d'Imagerie du Petit Animal, le Centre de Recherches Biologiques de Baugy, le Laboratoire de Mathématiques d'Orsay, l'Equipe Aérosols et cancer broncho-pulmonaire de l'Unité Inserm 618, l'Institut Telecom/Telecom SudParis, l'Equipe de Biomécanique de l'Institut de Recherche sur les Phénomènes Hors Equilibre et l'Hôpital Avicenne. Le projet Oxhelease vise à étudier l'impact de l'inhalation du mélange hélium-oxygène sur la ventilation, l'oxygénation sanguine, le dépôt d'aérosol dans l'asthme et l'emphysème. Il s'inscrit dans la suite des développements de l'IR4M sur l'imagerie par résonance magnétique pour la caractérisation des poumons. Dans ce cadre, ce travail de thèse centré sur la méthodologie IRM a spécifiquement consisté à mettre au point des méthodes d'imagerie et de traitement des données pour quantifier les dépôts d'aérosols chez le petit animal applicables dans des modèles de maladies respiratoires. Il s'agit de l'étude des mécanismes de contraste exploitables dans ce contexte, de la mise en place expérimentale, de la validation puis application *in vivo*.

Depuis la première image par résonance magnétique nucléaire obtenue par Lauterbur en 1973, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a évolué continuellement avec l'introduction de multiples phénomènes de contraste pour devenir un outil indispensable pour le diagnostic médical permettant d'enrichir les connaissances non seulement sur l'anatomie des organes mais également sur leur fonction.

Le poumon, un organe complexe, permet les échanges gazeux entre le sang et l'air en fournissant l'oxygène  $O_2$  nécessaire à la respiration cellulaire et en évacuant le dioxyde de carbone  $CO_2$  qui en résulte. L'aérosol, comme une suspension de particules solides ou liquides dans un gaz, a été introduit dans les années 1920 en météorologie. Initiée comme telle dans le courant des années 1950, la science des aérosols, depuis lors, s'est considérablement développée durant ces vingt dernières années. L'inhalation d'aérosols « médicaments » devient une voie d'administration attractive pour traiter des maladies respiratoires ou systémiques, grâce à ses avantages potentiels tels que son transfert rapide, non-destructif (par rapport à la voie orale) et non-invasif (par rapport à l'injection) de médicament dans la circulation sanguine. L'idée de pouvoir concevoir des médicaments ciblés par voie inhalée a été également proposée. Par ailleurs, les particules inhalées ( $<10\ \mu m$ ) en suspension dans l'air ambiant augmentent le risque de maladies pulmonaires aiguës et chroniques. Ce double aspect thérapeutique et toxicologique demande une meilleure compréhension du comportement des particules dans les voies respiratoires. En particulier, comme atteintes potentiellement liées à la pollution et traitées généralement par aérosolthérapie, l'asthme et les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) sont des maladies respiratoires chroniques majeures. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 300 millions de personnes souffrent de l'asthme, et les BPCO sont considérées comme la troisième cause de mortalité par maladie dans le monde en 2020. L'asthme implique une

inflammation chronique, le remodelage des voies aériennes et des bronchoconstrictions. L'emphysème est une BPCO caractérisée par la destruction de parois alvéolaires conduisant à l'élargissement des espaces aériens distaux et une insuffisance respiratoire associée.

Les mécanismes en jeu dans l'administration pulmonaire d'aérosol sont complexes, en termes d'administration, de dosage, de clairance et de toxicité. Les mécanismes principaux affectant le transport et le dépôt d'aérosol dans les poumons incluent l'impaction inertielle, la sédimentation gravitationnelle et la diffusion Brownienne. Néanmoins, les dépôts locaux de particules dans les poumons sont complexes et difficiles à prédire, à cause de la dépendance avec de nombreux paramètres, tels que le protocole d'administration, la morphologie de voies aériennes, le profil respiratoire, ou encore les propriétés aérodynamiques du gaz et des particules. L'évaluation du dépôt des aérosols dans les voies respiratoires *in vivo* et de leur élimination nécessite donc les outils d'imagerie performants. La radiologie et la médecine nucléaire peuvent être utilisées pour caractériser des dépôts. Ces techniques utilisent des rayonnements ionisants et ont des résolutions spatiales faibles ce qui limitent l'interprétation des distributions du dépôt et la corrélation avec l'anatomie, ainsi que les applications cliniques. L'IRM est moins conventionnelle que d'autres approches pour caractériser le poumon. En raison de la densité de proton réduite, des différences de susceptibilité magnétique et des mouvements respiratoires, l'IRM du poumon est difficile à réaliser.

Les progrès techniques de l'IRM et les multiples mécanismes de contraste dans les poumons peuvent être mis à profit pour obtenir des mesures exploitables des poumons. L'IRM sur les gaz, hyperpolarisé tels que hélium-3 ou le xénon-129, ou à polarisation thermique comme les gaz fluorés, permet de fournir des informations physiologiques variées des poumons, en imagerie statique, dynamique et fonctionnelle, enrichissant les connaissances sur cet organe par rapport aux autres techniques d'imageries. En ce qui concerne l'IRM du parenchyme en proton, l'administration intrapulmonaire d'agent de contraste IRM, combinée avec des séquences d'imagerie spécifiques ouvre de nouvelles possibilités d'étude des poumons. Les aérosols à base de manganèse offrent une solution intéressante en raison de leur diamètre hydrodynamique réduit et de leur solubilité élevée, pourtant leur toxicité reste importante suggérant un transfert limité chez l'homme. Les agents de contraste plus standards, tels que les particules paramagnétiques basées sur des chélates de Gadolinium et les nanoparticules superparamagnétiques basés sur des oxydes de fer ont été déjà administrés avec succès sous forme d'aérosol dans des modèles animaux. Les séquences plus conventionnelles, telles que l'écho de spin ou l'écho de gradients ont été appliquées pour détecter le rehaussement de contraste généré par les dépôts d'aérosol à base d'agents de contraste. Plus récemment, les séquences à temps d'écho ultra-court (UTE), plus adaptées à l'imagerie du parenchyme pulmonaire ont été implémentées pour contourner les problèmes des artefacts de mouvement respiratoires et de  $T_2^*$  courts dans les poumons. Des acquisitions UTE radiales ont été utilisées pour imager l'inflammation bactérienne pulmonaire après injection intraveineuse de particules d'oxyde de fer, ainsi que pour évaluer la biodistribution et la pharmacocinétique de nanoparticules basées sur du gadolinium par instillation intratrachéale chez les souris. Pour ce qui est du mode d'administration dans les poumons, comparé aux techniques d'administration intratrachéale couramment utilisées pour l'investigation pulmonaire, l'inhalation par le nez combinée avec une respiration spontanée est une technique appropriée pour étudier les dépôts



d'aérosol dans les poumons dans le cas où le profil respiratoire, les propriétés aérodynamiques de l'aérosol et l'homogénéité de distribution des particules sont les intérêts principaux.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sont principalement basés sur l'IRM à temps d'écho court. Une nouvelle méthode pour cartographier la distribution spatiale du dépôt d'aérosol et caractériser la cinétique pulmonaire des particules nébulisées chez des rats *in vivo* sur un système clinique à 1,5 T a été mise en place. Cette technique a été combinée à une administration de courte durée d'un aérosol de chélate de Gadolinium en respiration spontanée par le nez, permettant de mimer l'exposition chronique aux particules ou la délivrance de médicament par inhalation. Le manuscrit aborde les travaux menés autour de cet objectif, d'abord du point de vue théorique, puis expérimentalement par l'élaboration des matériels et méthodes de quantification. La validation de la technique a été effectuée sur des rats sains et son application sur modèles d'asthme et d'emphysème a été évaluée.

Ce manuscrit est organisé en cinq chapitres. Les deux premiers introduisent les bases nécessaires à la compréhension globale de la problématique traitée. Les trois chapitres suivants présentent le travail original réalisé. Il s'agit essentiellement d'un travail méthodologique pour déterminer les approches les plus pertinentes pour caractériser des dépôts d'aérosol dans les poumons par IRM.

Dans le premier chapitre sont introduites les bases physiques de l'IRM en général puis plus spécifiquement en relation avec l'imagerie des poumons et des agents de contraste. Le second chapitre a pour but de donner les éléments de base sur la physiologie pulmonaire et les aérosols nécessaires à la compréhension des résultats obtenus *in vivo* dans ce travail. Des aspects anatomiques et fonctionnels sur les poumons de rats sont d'abord introduits avant de décrire les mécanismes de dépôt et de clairance des aérosols. Ce chapitre propose également une revue synthétique des approches existantes de caractérisation des dépôts.

Le troisième chapitre détaille la mise en place des méthodes de quantification et du matériel expérimental dédié à l'évaluation des dépôts d'aérosol. Nous présentons dans un premier temps les méthodes de quantification des agents de contraste par IRM et comparons leur sensibilité de détection. Par la suite, la taille de différents aérosols (basés sur des chélates de Gadolinium et des perfluorocarbones liquides) pouvant servir d'agent de contraste par IRM et générés avec un nébuliseur sont caractérisés à l'aide de deux méthodes conventionnelles. La mise en place des équipements et des séquences pour l'imagerie *in vivo* du rat à 1,5 T est enfin présentée. En particulier, la faisabilité de l'imagerie de gaz et d'aérosols fluorés, à l'aide d'un système double noyaux proton-fluor, est implémentée et testée *in vitro* et *in vivo* sur des rats.

Dans le quatrième chapitre sont présentés la mise en place du protocole d'imagerie UTE *in vivo*, les méthodes d'analyse des images et les résultats obtenus sur des rats sains. Le protocole expérimental d'administration et d'imagerie de l'aérosol chez le rat est d'abord décrit. Pour réaliser la quantification, des méthodes d'analyses spécifiques globales et locales incluant des segmentations, des analyses de distributions et des statistiques sont développées. Enfin, les résultats sur le dépôt d'aérosol

total, régional, la clairance et les paramètres RMN associés sont présentés et discutés.

Dans le cinquième chapitre, l'IRM-UTE avec nébulisation de gadolinium est appliquée sur des modèles de maladies pulmonaires chroniques, respectivement l'asthme et l'emphysème. Dans cette partie, le développement de ces modèles est d'abord décrit, ainsi que l'adaptation du protocole expérimental par IRM. Enfin, les différences induites par les lésions physiopathologiques par rapport aux animaux contrôles sur les nombreux paramètres RMN extraits de la technique sont détaillés de manière extensive pour déterminer les paramètres pertinents à explorer dans de futures études. Par ailleurs, des résultats préliminaires de mise en place d'une étude multimodale, où l'IRM est comparée à la tomodensitométrie et à l'imagerie nucléaire sur les mêmes animaux sont présentés en annexe.

# **Chapitre 1.**

## **Base physiques de l'IRM dans le contexte de l'imagerie pulmonaire**

---

Depuis la mise en évidence de l'interaction entre des noyaux et une onde radiofréquence en 1938 (1 - Rabi 1992), le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) a donné naissance à des outils variés, d'abord dans des disciplines de la chimie, de la physique et de la biologie, et plus récemment de la médecine. Les concepts et les premières mesures par RMN ont été réalisées dans les années 1940 (2 - Bloch 1946, 3 - Purcell 1946) et c'était en 1973 que la première image bidimensionnelle par RMN a été obtenue sur des tubes d'eau (4 - Lauterbur 1989). Grâce à l'introduction de la variation spatiale du champ magnétique (appelé gradient), Lauterbur a ainsi réussi à discriminer spatialement l'aimantation nucléaire selon une direction, et en adaptant les concepts de la tomographie, à reconstruire des images. Les années suivantes, l'introduction de formes de gradients de champs magnétiques supplémentaires, avec les concepts de codage de phase (5 - Kumar 2011) et de sélection de coupe (6 - Mansfield 1977), combinés à l'utilisation de la transformée de Fourier (FT) pour reconstruire les images, instituèrent les fondements de cette technique d'imagerie tridimensionnelle. Depuis lors, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a évolué continuellement avec l'introduction de multiples phénomènes de contraste pour devenir un outil indispensable pour le diagnostic médical en permettant d'enrichir les connaissances sur le fonctionnement de l'organisme.

Lors de ce travail de thèse de physique, différentes méthodes et outils ont été développées pour réaliser l'imagerie quantitative par IRM de dépôt d'aérosols dans les voies aériennes pulmonaires du petit animal. Dans cette partie sont donc introduits les principes physiques de l'IRM en relation avec ce thème. Notamment, les techniques plus spécifiques d'imagerie pulmonaire par résonance magnétique seront introduites.

---

### ***1.1 Le phénomène de résonance magnétique nucléaire***

Le signal RMN trouve son origine dans l'aimantation nucléaire d'une population de noyaux atomiques possédant un moment cinétique intrinsèque, ou spin, non nul. Lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique statique, les noyaux s'aimantent vers l'équilibre thermique. Une onde radiofréquence accordée interagit avec les noyaux qui absorbent l'énergie de ce rayonnement électromagnétique dit 'à résonance'. Une fois que l'émission de cette onde est interrompue, le système revient à l'équilibre dans une phase de relaxation pendant laquelle la détection du signal RMN induit est effectuée.

### 1.1.1 Aimantation à l'équilibre thermique

Un noyau atomique est notamment caractérisé par son moment cinétique intrinsèque, nommé « spin » qui est décrit sous la forme d'un opérateur vectoriel hermitien  $\vec{I}$ . Le spin, combiné à la masse du noyau, caractérise le moment cinétique  $\vec{J}_n = \hbar \vec{I}$ . Compte tenu de la charge du noyau, on peut définir le moment magnétique  $\vec{m}_n = \gamma \hbar \vec{I}$  (avec  $\hbar = h/2\pi$ ,  $h$  constant de Planck ;  $\gamma$  rapport gyromagnétique du noyau). D'un aspect quantique, le nombre de spin  $I$  est défini par le carré de la norme du moment cinétique  $\vec{I}$  à la base des valeurs propres fondamentales  $|I, m_I\rangle$ , décrivant les états quantiques propres du spin,

$$\vec{I}^2 |I, m_I\rangle = I(I+1) \hbar^2 |I, m_I\rangle \quad (1.1)$$

où le vecteur  $|I, m_I\rangle$  correspond au formalisme de Dirac :  $I$  est entier ou demi-entier, et  $m_I$  est entier ou demi-entier prenant l'une des  $2I+1$  valeurs entre  $-I$  et  $I$ . Les valeurs propres de l'opérateur  $\vec{I}^2$  représentent l'ensemble des mesures possibles du carré de la norme du moment cinétique (7 - Feynman 1963).

Le noyau le plus abondamment utilisé est celui de l'hydrogène  $^1\text{H}$  qui, comme les noyaux d'hélium  $^3\text{He}$  et du fluor  $^{19}\text{F}$  par exemple, possède un nombre quantique de spin  $I = 1/2$ , ce qui signifie que leur composante  $I_z$  le long de l'axe  $Z$  du vecteur  $\vec{I}$  ne peut prendre que l'une des deux valeurs quantiques  $m_I = \pm 1/2$ , lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique  $\vec{B}_0$  aligné avec l'axe  $Z$ .

De manière générale, l'énergie d'un moment magnétique  $\vec{m}_n$  plongé dans un champ magnétique  $\vec{B}_0$  s'écrit comme l'opposé du produit scalaire des deux vecteurs, donc pour un spin  $1/2$  :

$$E_{\pm 1/2} = -\vec{m}_n \cdot \vec{B}_0 = \mp \frac{\gamma \hbar}{2} B_0 \quad (1.2)$$

ce qui correspond à une différence d'énergie  $\Delta E = |\gamma| \hbar B_0$  entre les deux états. La fréquence angulaire de transition  $\omega_0$  entre deux niveaux d'énergie, qui correspond à la résonance, est alors donnée par la pulsation de Larmor :

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (1.3)$$

La fréquence de résonance s'écrit alors :

$$f_0 = \frac{\omega_0}{2\pi} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (1.4)$$

Cette fréquence spécifique diffère en fonction des noyaux et dépend linéairement du champ magnétique. Elle se situe en pratique dans la gamme des radiofréquences. La Table 1.1 répertorie les rapports gyromagnétiques et fréquences correspondantes à 1,5 T pour quelques noyaux d'intérêt pour l'imagerie pulmonaire.

Noyau	Spin	$\gamma \times 10^{-7}$ (rad.T <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Abondance naturelle (%)	$f_0$ à 1,5T (MHz)	Polarisation à 1,5T (ppm)
<sup>1</sup> H	1/2	26,752	99,985	63,87	4,94 <sup>b</sup>
<sup>3</sup> He	1/2	-20,379	0,00014	48,65	3,77 <sup>b</sup>
<sup>19</sup> F	1/2	25,162	100	60,12	4,65 <sup>b</sup>
<sup>129</sup> Xe	1/2	-7,399	26 <sup>a</sup>	17,67	1,37 <sup>b</sup>

Table 1.1. Rapport gyromagnétique, abondance naturelle des isotopes, fréquence de Larmor et polarisation thermique à un champ magnétique de 1,5 T et 310K pour des noyaux présentant un intérêt pour l'imagerie pulmonaire : l'hydrogène pour l'imagerie du parenchyme et les autres noyaux pour l'imagerie des gaz. *a.* extraite de (8 - Mugler 2013) ; *b.* calculé de l'équation (1.7) ; les autres valeurs sont extraite de (9 - Décorps 2011).

Lorsqu'un ensemble  $N$  de spins ( $I = 1/2$ ) est placé dans ce champ magnétique statique, les états de spin sont distribués sur deux niveaux d'énergie avec respectivement un état de basse énergie (parallèle au champ,  $I_z = 1/2$  si  $\gamma > 0$ ) et un état de haute énergie (antiparallèle au champ,  $I_z = -1/2$  si  $\gamma > 0$ ). A température ambiante, les deux niveaux d'énergie tendent vers un équilibre thermique dans des proportions décrites par la statistique de Boltzmann :

$$\frac{n_{\uparrow}}{n_{\downarrow}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (1.5)$$

où  $n_{\uparrow}$  et  $n_{\downarrow}$  sont les nombres de noyaux respectivement dans l'état de basse énergie et haute énergie, en moyenne,  $T$  est la température absolue et  $k_B$  la constante de Boltzmann. Typiquement, à température ambiante et pour le proton dans un champ magnétique courant de l'ordre de 1,5 T, le rapport de population entre deux états est proche de 1 avec un surplus de quelques parties-par-million (ppm, voir Table 1.1). La différence relative de ces populations définit la polarisation nucléaire  $P$  :

$$P = \frac{n_{\uparrow} - n_{\downarrow}}{n_{\uparrow} + n_{\downarrow}} \quad (1.6)$$

A l'équilibre thermique et pour des températures proche de l'ambiante,  $\gamma \hbar B_0 \ll k_B T$  et un développement limité de l'expression précédente permet d'écrire la polarisation comme :

$$P \approx \frac{|\gamma| \hbar B_0}{2 k_B T} \quad (1.7)$$

L'excès de population dans l'état de basse énergie est à l'origine d'une aimantation nucléaire macroscopique alignée le long de l'axe du champ  $\vec{B}_0$  et d'amplitude  $M_0$  qui représente la densité moyenne de moment magnétique dans un volume  $V$ . Pour un ensemble de  $N_s = n_{\uparrow} + n_{\downarrow}$  spins  $1/2$  :

$$M_0 = \frac{N_s}{V} P \frac{\gamma \hbar}{2} \quad (1.8)$$

De manière générale, la RMN repose sur la polarisation à l'équilibre thermique des noyaux, mais il est

possible dans certains cas d'obtenir des polarisations hors équilibre (10 - Moller 2002) obtenues par des préparations particulières. On appelle alors cet état l'hyperpolarisation qui permet de gagner significativement en signal (entre 5 et 6 ordres de grandeur) car des polarisations proches de 1 peuvent être obtenues en pratique.

### 1.1.2 Mise hors équilibre de l'aimantation et retour à l'équilibre

L'évolution temporelle du vecteur décrivant l'aimantation nucléaire macroscopique  $\vec{M}$  résultant d'un ensemble de noyaux de spin 1/2 est décrite dans le référentiel du laboratoire ( $\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}$ ) par les équations de Bloch (2 - Bloch 1946):

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \gamma \vec{B} + \frac{(M_0 - M_z)\hat{z}}{T_1} - \frac{(M_x\hat{x} + M_y\hat{y})}{T_2} \quad (1.9)$$

Dans cette expression vectorielle, la variation de l'aimantation est la somme du produit vectoriel de l'aimantation avec le vecteur tournant  $\gamma \vec{B}$ , et de termes décrivant les processus de relaxation. La relaxation longitudinale (composante selon  $Z$ ) est caractérisée par  $T_1$ , temps de relaxation longitudinale décrivant le retour à l'équilibre thermique par échange d'énergie entre le système des spins et son environnement (relaxation spin-réseau). Le temps de relaxation transversale  $T_2$  s'applique à la composante transversale (normale à  $Z$ ) et décrit son retour à l'équilibre par échange d'énergie entre spins (relaxation spin-spin).

Afin d'écarter l'aimantation  $\vec{M}$  de sa position d'équilibre le long de  $\vec{B}_0$ , un champ radiofréquence noté  $\vec{B}_1$  est appliqué à la fréquence de Larmor pendant une phase d'excitation. Ce champ tournant a une action efficace quand il est appliqué perpendiculairement à  $\vec{B}_0$  et à résonance. Par exemple, on applique  $\vec{B}_1 = B_1(\cos \omega_0 t \hat{x} - \sin \omega_0 t \hat{y})$  d'amplitude constante et de pulsation  $\omega_0$ . Ce champ permet de définir un repère tournant à la fréquence de Larmor dans lequel l'expression des équations de Bloch est plus simple, en négligeant les termes de relaxation lors de la phase d'émission :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \gamma \vec{B}_1 \quad (1.10)$$

La Figure 1.1 illustre alors l'effet de basculement de l'aimantation dans le repère tournant. Si le champ  $\vec{B}_1$  est appliqué pendant un temps  $\tau$ , l'aimantation effectue une rotation d'un angle de basculement  $\alpha$  par rapport à  $B_0$  :

$$\alpha = \gamma B_1 \tau \quad (1.11)$$

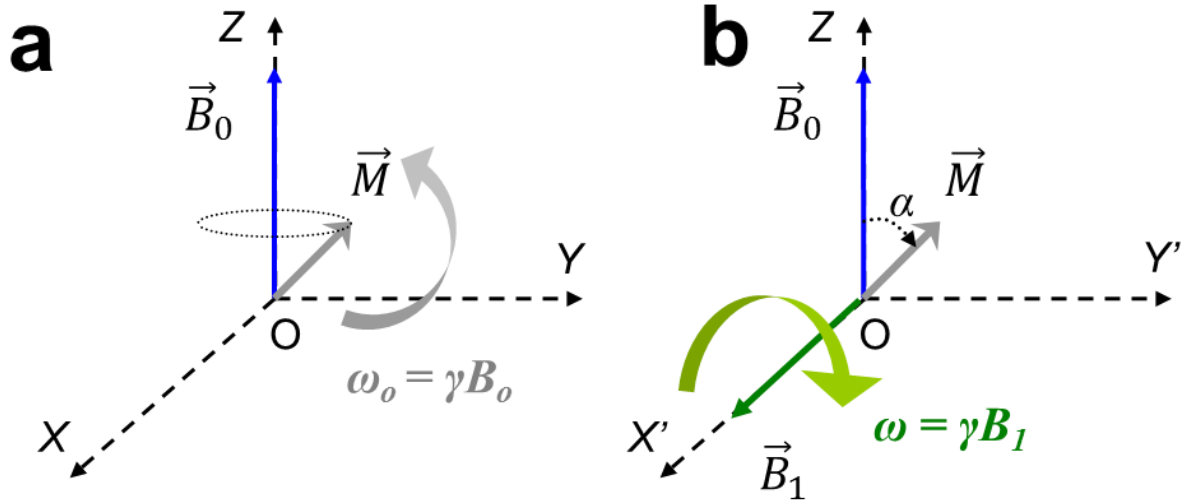


Figure 1.1. (a) mouvement de précession de l'aimantation  $\vec{M}$  autour du champ statique  $\vec{B}_0$  ; (b) mouvement de précession de l'aimantation  $\vec{M}$  autour du champ RF  $\vec{B}_1$  dans le repère tournant  $(x'y'z)$  autour de Oz à  $\omega = \omega_o$ ;  $\alpha$  est l'angle de basculement de l'aimantation.

Une fois le champ radiofréquence appliqué, le vecteur aimantation possède alors une composante transversale d'amplitude proportionnelle à  $M_0 \sin \alpha$  et une projection selon Z d'amplitude  $M_0 \cos \alpha$ . Le système va alors relaxer vers l'équilibre thermique en décrivant une décroissance exponentielle de l'aimantation avec les temps caractéristiques longitudinal et transversal. Le mouvement de l'aimantation longitudinale est alors décrit par :

$$M_z(t) = M_z(0) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) + M_0 \cos \alpha \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right) \quad (1.12)$$

L'aimantation transversale à la fin de l'impulsion RF est alors donnée dans le repère tournant comme :

$$M_{xy}(t) = M_0 \sin \alpha \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (1.13)$$

### 1.1.3 Antenne radiofréquence et observation du signal RMN

L'émission du champ radiofréquence et la détection du signal RMN sont effectués classiquement par induction dans un circuit accordé appelé « antenne radiofréquence ». Pour la gamme de fréquences d'intérêt en RMN, de quelques MHz à quelques centaines de MHz, une description quasi-statique des équations de Maxwell peut être suffisante si la taille de l'objet est inférieure à la longueur d'onde ce qui permet de négliger les effets de propagation. Une inductance  $L_c$  sous forme de bobine permet de coupler inductivement à l'objet exploré et de produire un champ radiofréquence dont la composante efficace est transversale à  $B_0$ . Pour rendre le système résonant, une capacité est ajoutée si bien qu'un modèle électronique simple de circuit RLC (résistance, inductance, capacité) permet de décrire les performances de l'antenne. Le facteur de qualité  $Q_c = \omega_0 L_c / R_c$ , où  $R_c$  est la résistance équivalente de l'antenne et  $\omega_0$  la pulsation de résonance correspondant à la pulsation de Larmor. En pratique,  $Q_c$

est mesuré à l'aide de la caractérisation de la bande passante (BW) à -3 dB :  $\Delta\omega_{3dB} = \omega_0/Q_c$ . Une antenne ayant un facteur de qualité élevé, montrant de faibles pertes intrinsèques, aura une bande passante utilisable étroite autour de  $\omega_0$ .

Cette antenne est connectée au système d'émission et permet alors de générer par induction des intensités de  $B_1$  de l'ordre de 10  $\mu$ T en pratique. Lors de la phase de réception, la composante transversale de l'aimantation  $M_{\perp}(t)$  qui effectue un mouvement de précession autour de  $B_0$  à la fréquence de Larmor, induit alors une force électromotrice (fem) dans la bobine de réception et permet d'avoir une mesure de la variation temporelle du flux magnétique à travers la bobine. Le signal de précession libre, ou FID (Free Induction Decay), est alors mesuré après amplification.

En pratique, la mesure est effectuée sur un volume, et les fréquences de résonance ne sont pas exactement uniformes dans la zone explorée. Des inhomogénéités du champ magnétique induisent une dispersion des fréquences et le signal mesuré correspond à la résultante moyenne. Cet aspect dispersif est caractérisé phénoménologiquement par un temps apparent de relaxation transversale  $T_2^*$  plus court que  $T_2$ . Après le basculement de l'aimantation à l'équilibre d'un angle  $\alpha$ , celui-ci est proportionnel à l'aimantation transversale et aura donc une évolution temporelle de la forme :

$$S(t) \propto \omega_0 M_0 \sin \alpha \exp\left(-\frac{t}{T_2^*} + i\omega t\right) \quad (1.14)$$

Comme on peut le voir, le signal RMN échantillonné lors d'une FID permet donc d'avoir accès à la densité de protons via  $M_0$ , à la fréquence de résonance effective  $\omega$  et au temps apparent de relaxation transversale  $T_2^*$ .

## 1.2 La formation de l'image par RMN

Pour passer du phénomène de RMN à l'imagerie, il est nécessaire de discriminer le signal en fonction de la position. En IRM, le codage spatial repose sur l'application successive de variations spatiales (gradients) du champ magnétique dans les 3 dimensions de l'espace. La fréquence de résonance des spins, proportionnelle à l'amplitude du champ, est alors directement dépendante de la position. Les gradients sont appliqués successivement pour recueillir les fréquences spatiales de l'objet imagé (nommé plan de Fourier ou espace  $k$ ) définissant une séquence d'imagerie. La reconstruction dans le domaine image est finalement effectuée avec des outils d'analyse spectrale tels que la transformée de Fourier.

### 1.2.1 Les gradients

Pour obtenir la discrimination spatiale selon les trois directions de l'espace, on superpose à la composante selon  $Z$  du champ statique  $B_0$  une variation linéaire, de façon à ce que la fréquence de Larmor varie avec la position. Par exemple, si le gradient d'amplitude  $G_z$  est appliqué selon  $Z$ , la fréquence dépend alors de la position :



$$\omega(z) = \gamma B_0 + \gamma z G_z = \omega_0 + \Delta\omega(z) = 2\pi \times (f_0 + \Delta f(z)) \quad (1.15)$$

Ces gradients sont physiquement appliqués dans 3 bobinages distincts dont la géométrie permet de modifier le champ dans une région donnée de l'espace selon 3 axes orthogonaux. L'application combinée de gradients sur plusieurs axes ayant pour effet de définir une direction oblique, on distingue les 3 axes physiques de 3 axes logiques utilisés dans les séquences d'imagerie et qui sont réorientables à loisir. Ces axes logiques seront notés pour le gradient de lecture  $G_r$  sur l'axe de  $X$ , pour le gradient de codage de phase  $G_p$  sur l'axe  $Y$  et pour le gradient de sélection de coupe  $G_s$  sur l'axe de  $Z$ . Les trois principes de base de la localisation par IRM, la sélection de coupe et les codages de lecture et de phase sont brièvement décrits par la suite.

### 1.2.2 La sélection de coupe

Le principe de la sélection de coupe consiste en l'application simultanée d'une excitation RF sélective en fréquence et d'un gradient dit de sélection de coupe  $G_s$ . Cette impulsion radiofréquence possède une fréquence centrale et une largeur spectrale, ce qui permet de n'exciter que l'aimantation qui résonne dans cette gamme. L'épaisseur de coupe  $\delta z$  est directement proportionnelle à la largeur spectrale  $\delta f$  (bande passante) de l'impulsion RF selon :

$$\delta z = \frac{2\pi \delta f}{\gamma G_s} \quad (1.16)$$

En pratique pour réaliser un petit angle de bascule, une impulsion RF modulée en amplitude selon la fonction sinus cardinal (sinc) réalisera la sélection spectrale souhaitée. La Figure 1.2 montre le résultat d'une impulsion RF sélective sous forme d'un sinc apodisé avec 3 lobes. Pour réduire les oscillations hors de la bande passante de l'impulsion sélective dues à la troncature, la fonction temporelle d'excitation est fréquemment multipliée par une fonction d'apodisation (fonction de Hamming par exemple). Par conséquent, l'amplitude des lobes latéraux est significativement réduite (Figure 1.2a). La transformée de Fourier d'une impulsion sinc est un rectangle, qui correspond à une coupe excitée (Figure 1.2b). L'impulsion  $\alpha = 90^\circ$  entraîne donc un basculement de l'aimantation dans le plan  $XY$  (Figure 1.2c).

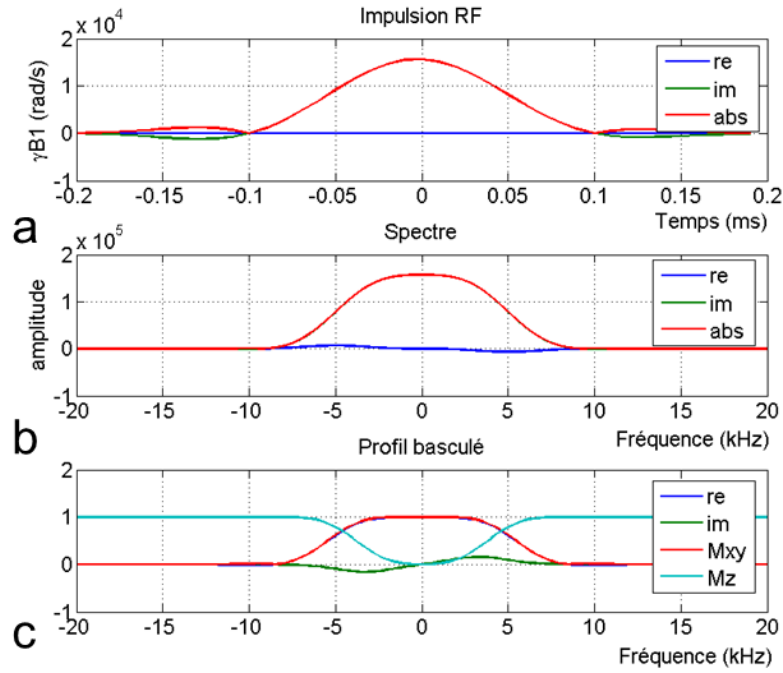


Figure 1.2. L'impulsion RF sélective sous forme d'un sinc avec 3 lobes dans le domaine temporel (a), son spectre dans le domaine fréquentiel obtenu par transformée de Fourier (b) et les profils correspondants à l'aimantation excitée (c) (Parties réelle, imaginaire et valeur absolue de  $M_{xy}$ , ainsi que la composante longitudinale  $M_z$ ).

### 1.2.3 La lecture

Une fois l'aimantation mise hors équilibre dans une région de l'espace, la localisation est possible selon une direction avec l'application d'un gradient de lecture  $G_r$ , appelé également gradient de codage par la fréquence. L'effet du gradient est de disperser les fréquences sur une certaine gamme qui dépend de l'étendue spatiale dans cette direction. Le signal est acquis pendant l'application du gradient. En ajustant correctement la bande passante (qui définit le champ de vue ou FOV, Field-Of-View) et la fréquence centrale de l'acquisition (qui définit la position selon la lecture), et par l'analyse spectrale du signal échantillonné, il est alors possible d'associer à chaque position un signal proportionnel à l'aimantation transversale.

La Figure 1.3 montre un exemple de gradient de lecture dans une séquence en echo de gradient. La durée qui sépare l'impulsion RF initiale du sommet de l'écho est nommée le temps d'écho TE. C'est un paramètre essentiel des séquences d'imagerie puisqu'il permet de jouer sur le contraste  $T_2^*$ .  $T_{\text{obs}}$  est défini comme la durée totale de la fenêtre d'acquisition du signal. Lors de l'application du gradient de lecture, précédé d'un gradient de préphasage, le signal échantillonné  $s$  peut être écrit en introduisant la fréquence spatiale  $k_x$  :

$$s(k_x) = \int_x S(x) \exp(-i2\pi k_x x) dx \quad (1.17)$$

où  $S(x)$  est le signal exprimé en fonction de  $x$ , avec :

$$k_x(t') = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^{t-TE} G_r dt' \quad (1.18)$$

On reconnaît la transformée de Fourier de la distribution de l'aimantation selon  $X$ . Le gradient de lecture correspond donc à un échantillonnage régulier au cours du temps des fréquences spatiales de  $-k_{xMAX}$  à  $+k_{xMAX}$ . Une transformée de Fourier inverse permet alors d'estimer la dépendance spatiale du signal selon  $x$ .

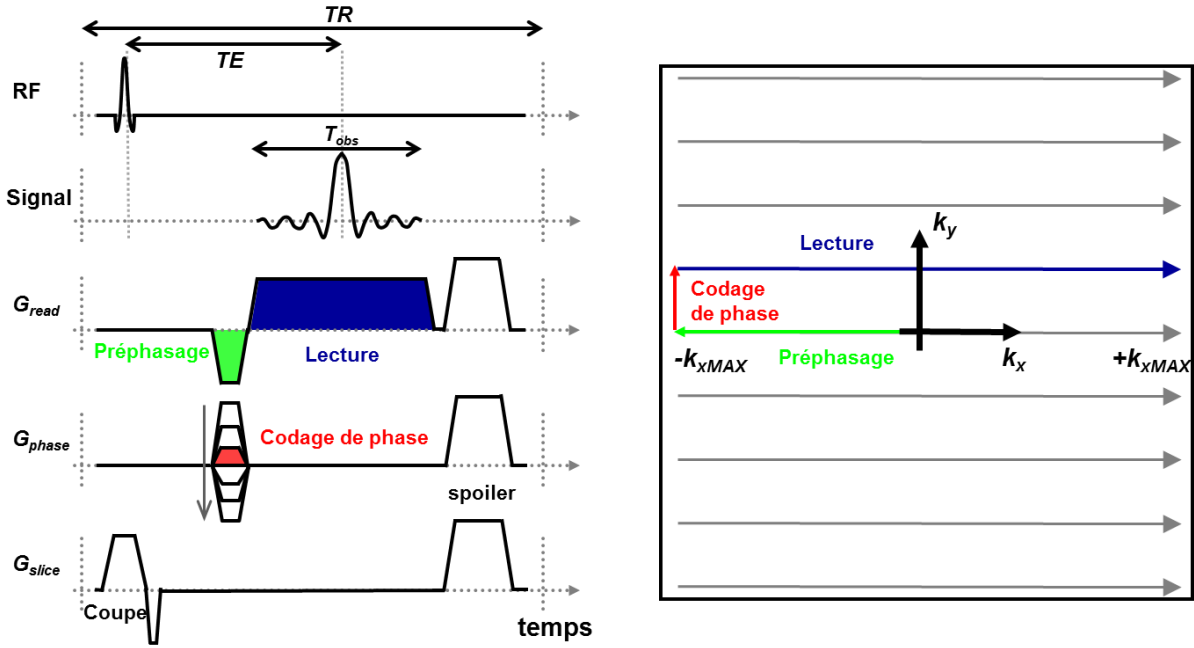


Figure 1.3. Chronogramme de la séquence en écho de gradient (gauche) et trajectoire cartésienne correspondante dans le plan de Fourier (droite). L'action des différents gradients correspond à un déplacement dans le plan de Fourier pour échantillonner les fréquences spatiales.

#### 1.2.4 Le codage de phase

L'image bidimensionnelle peut être obtenue à l'aide d'un codage de phase  $G_p$ . Conceptuellement, le codage par la phase permet d'obtenir l'échantillonnage discret des fréquences spatiales, en général dans la direction perpendiculaire à la sélection de coupe et à la lecture. En effet, en définissant la fréquence spatiale  $k_y = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t G_p(t') dt'$ , le signal juste à la fin de l'application du gradient est :

$$s(k_y) = \int_y S(y) \exp(-i2\pi k_y y) dy \quad (1.19)$$

Si l'expérience est répétée avec une aire différente, il est alors possible d'acquérir différentes fréquences spatiales selon la direction  $k_y$ . En pratique, ce gradient est appliqué après l'excitation RF et avant le début de l'échantillonnage du signal de lecture, et peut être simultané avec le gradient de préphasage pour une séquence écho de gradient. La Figure 1.3 récapitule ces différents éléments. Pour obtenir une image comportant  $N_y$  lignes, il est nécessaire de répéter  $N_y$  acquisitions avec des décalages

de phase différents, incrémentés régulièrement de  $2\pi/FOV_y$  en appliquant le gradient de codage de phase. Chaque pas de codage est répété après TR, le temps de répétition de la séquence. Le temps d'acquisition total d'une image 2D est donc donné par  $T_{acq} = N_y TR$ .

### 1.2.5 Le plan de Fourier

Le plan de Fourier est un outil indispensable à la compréhension de l'imagerie par RMN. Le signal RMN récupéré en présence des différents gradients est constitué de la superposition de signaux aux différentes fréquences de précession locales (11 - Haacke 1999). En récapitulant les effets des gradients de lecture et de phase, le signal échantillonné peut se mettre sous la forme :

$$s(\vec{k}) = \int_V S(\vec{r}) \exp[-i2\pi(\vec{k} \cdot \vec{r})] d\vec{r}^3 \quad (1.20)$$

$S(\vec{r})$  est le signal RMN provenant du point de coordonnées  $(\vec{r})$ . Le vecteur d'onde  $\vec{k}$  représente la coordonnée dans le domaine de fréquence nommé « espace  $k$  » ou « Plan de Fourier ». Le vecteur d'onde est complètement déterminé par l'aire des gradients appliqués après une excitation à  $t = 0$  :

$$\vec{k}(t') = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t \vec{G}(t') dt' \quad (1.21)$$

Les expressions précédentes montrent que la distribution de signal RMN dans l'espace image  $S(\vec{r})$  correspond à la transformée de Fourier du signal échantillonné dans l'espace  $k$   $s(\vec{k})$ . Pour reconstruire une image, une transformée de Fourier peut être utilisée lorsque les fréquences spatiales sont suffisamment échantillonnées. La façon d'échantillonner le plan de Fourier est modulable en jouant sur l'évolution temporelle des gradients et en répétant leur application. Plusieurs façons d'échantillonner le plan de Fourier et utilisées dans ce travail sont définies par la suite.

### 1.2.6 Remplissages cartésien et radial du plan de Fourier

Une séquence d'imagerie décrit l'évolution temporelle des impulsions radiofréquences nécessaires au basculement de l'aimantation dans le plan transversal et à la manipulation des spins, ainsi que l'application des gradients permettant le codage spatial ou les pondérations recherchées dans le signal. Elle est communément représentée par un chronogramme (voir Figure 1.3 par exemple). Au cours d'une séquence, le codage spatial du signal peut être réalisé par les différents balayages de l'espace  $k$  (12 - Bernstein 2004).

La grande majorité des applications IRM utilisent le remplissage cartésien du plan de Fourier : les points de codage sont uniformément distribués ligne par ligne et une transformée de Fourier rapide (FFT) peut être utilisée pour reconstruire les images (voir la Figure 1.3 par exemple).

Des remplissages non-cartésiens existent néanmoins et peuvent présenter certains avantages. C'est le

cas du remplissage radial dans lequel des rayons partent du centre de l'espace  $k$  vers la périphérie (Figure 1.4). Un gradient de lecture  $G_r$  est répété avec une orientation d'un angle  $\theta$  qui varie d'une répétition à l'autre. Pour respecter le critère de Nyquist et éviter un repliement de spectre, il faut alors que la plus grande distance dans le plan de Fourier entre les rayons soit de l'ordre de l'inverse du champ de vue, ce qui fixe le nombre d'angulation à réaliser. Il est pertinent de noter à ce stade que chaque rayon ou diamètre dans le plan de Fourier correspond à l'acquisition d'un profil de l'objet selon une orientation  $\theta$ . Cette approche est donc équivalente aux autres approches d'imagerie tomographiques. Une fois l'espace  $k$  suffisamment échantillonné, la reconstruction peut être faite par ré-échantillonnage sur une grille cartésienne avant FFT (12 - Bernstein 2004), ou par rétro-projection filtrée, par exemple.

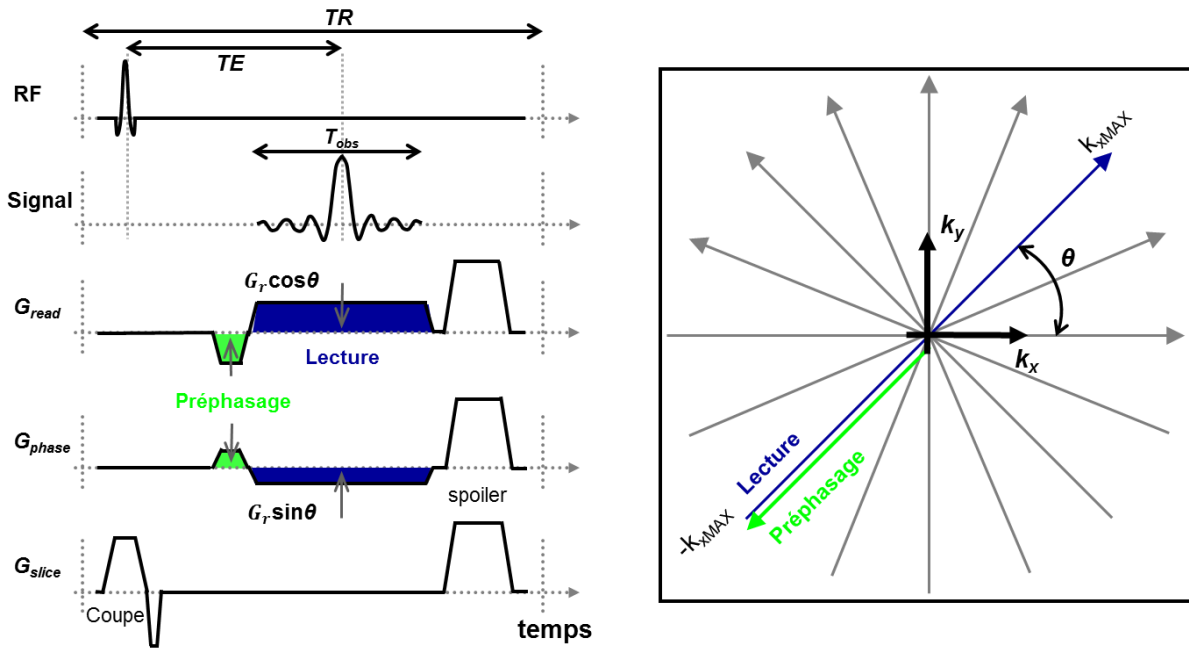


Figure 1.4. Chronogramme de la séquence radiale (gauche) et trajectoire correspondante dans le plan de Fourier (droite).

### 1.3 Aspects quantitatifs de l'IRM

Le succès de l'IRM pour les applications biomédicales résulte en grande partie de la diversité des types d'information qu'il est possible d'obtenir, notamment au travers de la modulation des contrastes. Dans cette partie sont introduits les concepts et méthodes de mesures quantitatives utilisées dans ce travail comme les rapports signal et contraste sur bruit, les pondérations et quantification des paramètres relaxométriques, ainsi que les effets de la susceptibilité magnétique donnant naissance au contraste de phase. Enfin, les effets des agents de contraste standards disponibles pour l'IRM seront décrits.

### 1.3.1 Signal, contraste et bruit

La sensibilité de l'IRM est décrite par deux notions importantes, le rapport signal sur bruit (RSB) et le contraste sur bruit (RCB). Le RSB est un facteur déterminant pour le choix des paramètres de séquence puisqu'il détermine la qualité d'image. La distinction entre tissus est caractérisée par le RCB. On détaille dans cette partie les différents éléments pour évaluer la qualité de la mesure.

#### 1.3.1.1 *Signal*

Le signal détecté dans l'antenne de réception peut être décrit de manière absolue par le principe de réciprocité (13 - Hoult 1979). En considérant un voxel de volume  $V_{\text{voxel}}$  ayant une aimantation uniforme  $M_{xy}$  à une position donnée, le signal induit dans l'antenne par cet élément de volume est donné par :

$$S = \omega_0 \frac{B_1}{I} M_{xy} V_{\text{voxel}} \quad (1.22)$$

Dans cette expression,  $B_1$  est le champ radiofréquence qui est produit en ce point si la bobine d'émission est parcourue par un courant  $I$ . Le rapport  $B_1/I$  correspond à la sensibilité de l'antenne et dépend de la géométrie de celle-ci.

#### 1.3.1.2 *Bruit*

Le bruit en IRM correspond principalement aux fluctuations aléatoires des porteurs de charges dans le système, résultant de l'agitation thermique. Ces fluctuations peuvent avoir lieu dans le conducteur lui-même au travers de sa résistance propre, mais également dans l'environnement immédiat de l'antenne et induire des fluctuations aléatoires dans celle-ci. En pratique, pour l'imagerie sur le vivant, on s'arrange pour que le bruit thermique provenant du patient soit dominant (celui-ci ne pouvant pas être réduit), ce qui implique que le bruit de l'antenne ne limite pas la qualité de la mesure. Pour synthétiser les différentes sources de bruit, la résistance effective de l'antenne chargée par l'échantillon  $R_{eq}$  est introduite, ainsi que la température équivalente  $T_{eq}$ . La variance associée à une source de bruit est ensuite représentée par une force électromotrice aléatoire et donnée par (14 - Macovski 1996) :

$$\sigma_m^2 = 4k_B T_{eq} R_{eq} \cdot BW \quad (1.23)$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann et  $BW$  la bande passante du système d'acquisition. Cette variance représente la somme des variances des différentes sources de bruit, au travers de  $R_{eq}$  et  $T_{eq}$ , et caractérise complètement le phénomène aléatoire décrit par une distribution de probabilité normale de moyenne nulle notée  $\mathcal{N}(0, \sigma_m^2)$ .

#### 1.3.1.3 *Rapport signal sur bruit (RSB)*

En considérant les formules précédentes (1.22) (1.23), le rapport signal sur bruit dans un volume  $V_{\text{voxel}}$

est donné par:

$$RSB = S/\sigma_m = k \frac{M_{xy} \cdot V_{voxel}}{\sqrt{BW}} = k M_{xy} \cdot V_{voxel} \sqrt{T_{acq,eff}} \quad (1.24)$$

Avec  $k = \omega_0 \frac{B_1}{I} / \sqrt{4k_B T_{eq} R_{eq}}$ . Cette expression permet de voir que, pour un système de détection donné, le RSB est directement proportionnel à l'aimantation transversale, à la taille du voxel et au temps d'acquisition effectif du signal  $T_{acq,eff}$ . En effet, la variance associées à des mesures répétées du même signal se sommant, BW est ici équivalent à l'inverse de  $T_{acq,eff}$ . Ainsi, par exemple, lors de l'acquisition d'une image tridimensionnelle de taille  $N_x \times N_y \times N_z$ , pour laquelle le signal d'un voxel est acquis  $N_{acq} = N_x \times N_y \times N_z$  fois avec un temps d'échantillonnage  $t_{éch}$ , le temps d'acquisition effectif sera de  $T_{acq,eff} = N_{acq} \times t_{éch} = T_{obs} \times (T_{acq}/TR)$ , avec  $T_{obs}$  la durée totale d'échantillonnage de lecture et  $T_{acq}$  la durée totale d'acquisition.

#### 1.3.1.4 Estimation du RSB en pratique

On notera que la mesure du signal RMN est intrinsèquement liée à la radiofréquence autour de la fréquence de Larmor et que deux composantes sont extraites après démodulation,  $M_x$  et  $M_y$ . Le signal peut être exprimé sous la forme du signal complexe avec une partie réelle correspondant à  $M_x$  et imaginaire à  $M_y$ . Le bruit associé est en pratique considéré blanc (le même pour toutes les fréquences sur la gamme explorée), et a une variance identique sur les deux composantes mesurées. Très souvent, les images reconstruites sont analysées en module ce qui a pour effet de modifier la statistique du bruit pour des RSB faibles. Puisque le bruit est considéré comme blanc, celui-ci peut être caractérisé dans une région sans signal, avec la connaissance de la statistique de bruit associée (soit gaussienne sur les parties réelle et imaginaire, soit ricienne sur l'image en module (15 - Andersen 1996)). De manière générale pour estimer le RSB sur une image, la valeur moyenne du signal est calculée dans une zone d'intérêt, et l'écart-type du bruit de fond sur une zone sans signal :

$$RSB = \frac{|S|}{\sigma_{fond}} \quad (1.25)$$

Dans le cas de l'utilisation de plusieurs récepteurs ou des séquences d'imagerie particulières avec leur reconstructions associées (telles qu'avec l'imagerie radiale), la statistique du bruit dans l'image est modifiée. Bien que ne reflétant alors que partiellement le bruit thermique, l'estimation du RSB à partir de l'écart-type dans une région sans signal permet néanmoins de caractériser la qualité de l'image en pratique.

#### 1.3.1.5 Contraste sur bruit (RCB) et critère de Rose

En imagerie, on s'intéresse au contraste entre différents tissus, ou à la variation du signal au cours du temps d'un tissu donné. La question se pose alors de la capacité à différencier ces variations et de sa

précision. Le rapport contraste sur bruit (RCB), est défini comme la différence de signal entre deux mesures A et B par rapport à l'écart-type du bruit :

$$RCB_{AB} \equiv \frac{S_A - S_B}{\sigma_{fond}} = RSB_A - RSB_B \quad (1.26)$$

On peut alors s'appuyer sur le RCB pour définir un critère statistique de détectabilité qui permet d'assurer la significativité des mesures. En théorie, pour une distribution de bruit gaussienne un  $RCB > 4$  permet de distinguer deux structures avec une probabilité de bonne classification de 97,5%. Dans ce sens, le critère de Rose est basé sur des observations empiriques à partir de l'expérience en imagerie diagnostique. On estime en pratique qu'un RCB de 3 à 5 est nécessaire pour pouvoir différencier deux structures de façon fiable (11 - Haacke 1999).

### 1.3.2 Mécanisme et utilisation de la relaxation

#### 1.3.2.1 Relaxation et mobilité de l'eau

Les temps de relaxation sont liés à la mobilité de l'eau dans les tissus. Le modèle de diffusion rapide des protons (Fast Proton Diffusion, FPD) (16 - Fullerton 1982) représente bien les résultats expérimentaux dans des cas variés. Dans ce modèle, l'eau est répartie en trois compartiments : eau libre, eau liée et eau cristalline. Comme leur nom l'indique, l'eau libre diffuse librement et l'eau liée participe aux couches d'hydratation des protéines et des macromolécules, tandis que l'eau cristalline est caractéristique du solide.

L'eau présente dans les compartiments libre et liée est en échange rapide, avec les temps d'échange très largement inférieurs aux temps de mesure. L'eau cristalline possède intrinsèquement une relaxation longitudinale très lente et une relaxation transversale très rapide, n'ayant qu'un échange lent spin-spin avec l'eau liée et donc un effet sur la relaxation transversale. En général, le temps de relaxation moyen observé dans les tissus est évaluable avec ce modèle à partir des fractions et des temps de relaxation respectifs de ces deux milieux :

$$\frac{1}{T_{1,observé}} = \frac{f_{\text{eau libre}}}{T_{1,\text{eau libre}}} + \frac{f_{\text{eau liée}}}{T_{1,\text{eau liée}}} \quad (1.27)$$

$$\frac{1}{T_{2,observé}} = \frac{f_{\text{eau libre}}}{T_{2,\text{eau libre}}} + \frac{f_{\text{eau liée}}}{T_{2,\text{eau liée}}} + \frac{f_{\text{eau liée}}}{T'_{2,\text{eau liée}}} \quad (1.28)$$

où  $f$  présente la fraction de compartiment par rapport à l'eau totale,  $T_1$  et  $T_2$  respectivement le temps de relaxation longitudinale et transversale et  $T_2'$  est le temps de relaxation effectif. Ici,  $T'_{2,\text{eau liée}}$  est influencé par la décroissance transversale de l'eau cristalline et par un délai dû aux couches d'hydratation. Les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  des tissus dépendent alors de la mobilité des noyaux d'hydrogène présents dans ces tissus.



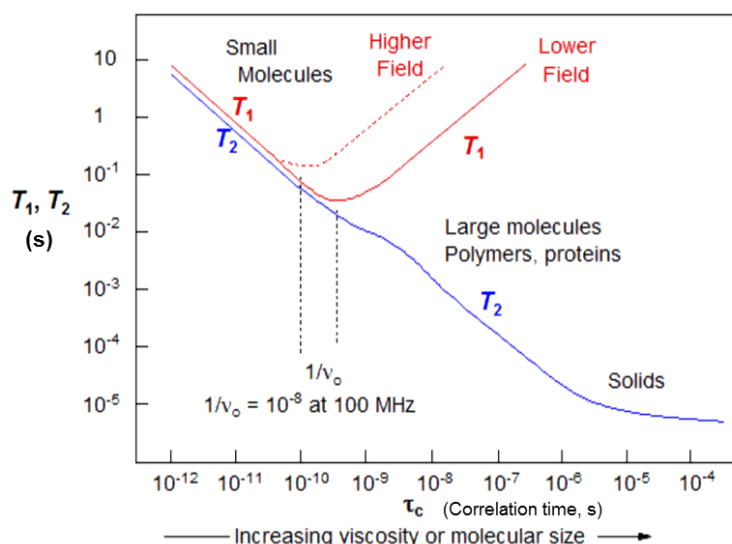


Figure 1.5. Tendence pour  $T_1$  et  $T_2$  en fonction du temps de corrélation. Extraite de <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/08-tech-01-relax.htm> adapté de (17 - Bloembergen 1948).  $\tau_c$  est le temps de corrélation moléculaire.  $T_2$  varie inversement avec l'augmentation du temps de corrélation (courbe bleu) ; tandis que  $T_1$  décroît d'abord avec une augmentation de  $\tau_c$ , puis entre dans une transition à partir de  $1/\nu_0$  ( $\nu_0$  fréquence de résonance) puis augmente ensuite avec  $\tau_c$ .

La Figure 1.5 montre la relation entre les relaxations et la mobilité de noyaux d'hydrogène caractérisée par le temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$ . Ce temps est défini comme une durée caractéristique d'une molécule à tourner d'un radian par collision. Il s'allonge avec la viscosité et avec la taille des molécules, impliquant une baisse de mobilité. Les relaxations RMN sont induites par les interactions de protons avec les champs magnétiques oscillant des protons voisins. L'eau libre diffuse rapidement avec un  $\tau_c$  très court, et possède des  $T_1$  et  $T_2$  comparables ; alors que l'eau sous forme de solide possède un  $T_1$  extrême long et  $T_2$  très courts.

### 1.3.2.2 Généralité sur les types de contraste en fonction des séquences

Comme il a été déjà introduit, une variété de types de contrastes en IRM sont utilisables, parmi lesquels le plus couramment utilisés sont la densité de proton  $M_0$  et les temps de relaxation  $T_1$ ,  $T_2$  et  $T_2^*$  (11 - Haacke 1999). Les paramètres d'imagerie permettant de jouer sur ces contrastes sont les temps de répétition TR et l'angle de bascule  $\alpha$ , ainsi que le temps d'écho TE. Le contraste  $T_1$  peut être optimisé par le changement de TR et de  $\alpha$  qui jouent plus directement sur l'aimantation longitudinale. Les contrastes  $T_2$  (pour une séquence en écho de spin) et  $T_2^*$  (pour une séquence en écho de gradient) sont modulés avec le paramètre TE. Le tableau suivant résume les tendances générales pour sensibiliser les images.

Type de contraste	TR / $\alpha$	TE
Densité de proton	Long devant $T_1$ / faible	Court
$T_1$	Court devant $T_1$ / élevé	Court
$T_2/T_2^*$	Long devant $T_1$ / faible	De l'ordre de $T_2/ T_2^*$

Table 1.2. Résumé général des paramètres de séquence pour générer différents contrastes.

### 1.3.2.3 Optimisation du signal et du contraste en imagerie rapide « spoiled »

L'imagerie rapide implique une répétition successive d'excitations ne permettant pas un retour de l'aimantation à l'équilibre thermique. D'une manière générale, la dénomination « spoiled » dans une séquence IRM fait référence à une annulation complète de la composante transversale de l'aimantation à la fin de chaque répétition. Dans le contexte d'une séquence en écho de gradient rapide, un équilibre dynamique est obtenu et le signal va dépendre fortement de l'angle et du temps de répétition :

$$S = M_0 \sin \alpha \frac{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)}{1 - \cos \alpha \cdot \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)} \exp\left(-\frac{TE}{T_2^*}\right) \quad (1.29)$$

Deux notions sont alors importantes, respectivement la maximisation du signal obtenue à l'angle de Ernst et la maximisation de la sensibilité à une variation de  $T_1$  définissant l'angle de Buxton.

En dérivant l'expression précédente par rapport à l'angle, il est possible de trouver l'angle qui maximise le signal donc correspond à un RSB optimal, c'est l'angle de Ernst défini tel que :

$$\cos \alpha_E = \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \quad (1.30)$$

Similairement à l'approche de Buxton et al. (18 - Buxton 1987), dans une optique de maximisation du contraste, on peut chercher à être plus sensible à une modification de  $T_1$ , comme celle qui est induite par l'ajout d'agent de contraste. En dérivant l'expression du signal à l'équilibre dynamique par rapport à  $T_1$ , il est possible de déterminer un angle qui maximisera cette variation de signal, c'est l'angle de Buxton pour lequel :

$$\cos \alpha_B = \frac{1 - 2 \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)}{\exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) - 2} \quad (1.31)$$

Ce dernier angle est supérieur à l'angle de Ernst. La Figure 1.6 suivante présente un exemple de signal en fonction de l'angle de bascule, ainsi que la sensibilité à une variation de  $T_1$ .

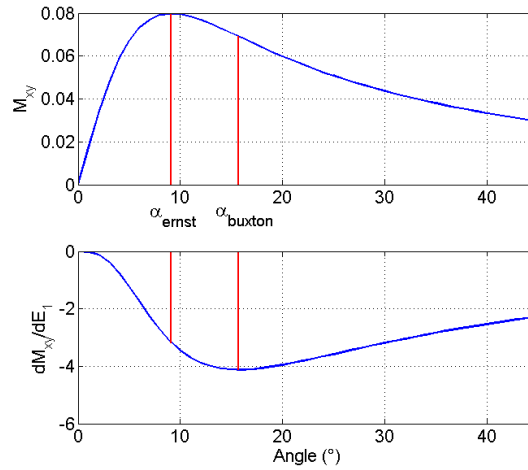


Figure 1.6. Aimantation transversale (pour  $M_0 = 1$ ) mesurée en fonction de l'angle pour  $T_1 = 1100$  ms et  $TR = 14$  ms et dérivée de l'aimantation en fonction de  $E_1 = \exp(-TR/T_1)$ . Le signal est maximisé à l'angle de Ernst alors que le « contraste  $T_1$  » sera maximisé à l'angle de Buxton.

### 1.3.3 Relaxométrie

La relaxométrie consiste à mesurer les temps de relaxation d'une population de proton. Les séquences relaxométriques sont donc adaptées au paramètre à caractériser,  $T_1$ ,  $T_2$  ou  $T_2^*$ .

#### 1.3.3.1 Mesure de $T_1$

Comme le signal mesuré n'est lié qu'à l'aimantation transversale, il est impossible d'observer directement des variations temporelles de la composante longitudinale par induction. Il est possible néanmoins de préparer l'aimantation longitudinale en la laissant évoluer pour ensuite la mesurer à la suite d'une projection dans le plan transversal. Une séquence courante est nommée « inversion-récupération » (IR) dans laquelle on inverse complètement l'aimantation par rapport à son état d'équilibre à l'aide d'une impulsion  $\pi$ . Le système évolue ensuite pendant un temps  $TI$ , temps d'inversion, à la suite duquel l'aimantation est basculée dans le plan transversal avec une impulsion  $\pi/2$ . L'aimantation mesurée est alors liée à  $T_1$  :

$$M_{xy} = M_0 \left( 1 - 2 \exp\left(-\frac{TI}{T_1}\right) \right) \quad (1.32)$$

En acquérant le signal pour plusieurs valeurs de  $TI$ , il est ensuite possible d'ajuster le signal à ce modèle pour déterminer  $T_1$ . Une variante de ce type de quantification est nommée « saturation-récupération » (SR) et consiste à annuler l'aimantation transversale plutôt qu'à l'inverser. Toutefois, les temps d'acquisition de ce genre de techniques peut être relativement longs car il faut en général attendre un retour à l'équilibre thermique de l'aimantation ( $\sim 5T_1$ ) ce qui implique un temps de répétition long et limite leur utilisation en pratique (19 - Crawley 1988). Une approche alternative est de cartographier  $T_1$  par des techniques plus rapide basées sur des acquisitions avec plusieurs angles de basculement (VFA, pour Variable Flip Angle) (20 - Fram 1987). Le signal à l'état d'équilibre

dynamique  $S_i$  acquis avec un angle  $\alpha_i$  donné par (1.29) peut s'exprimer comme:

$$S = M_0 \sin \alpha_i \frac{1 - E_1}{1 - \cos \alpha_i \cdot E_1} E_2 \quad (1.33)$$

avec  $E_1 = \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)$  et  $E_2 = \exp\left(-\frac{TE}{T_2^*}\right)$ . Des angles de basculement différents sont acquis, et  $T_1$  peut être déterminé par ajustement à ce modèle. Une façon populaire de faire cet ajustement est via une transformation de l'équation précédente sous une forme linéaire  $Y_i = mX_i + b$  (21 - Cheng 2006) :

$$\frac{S_i}{\sin \alpha_i} = E_1 \frac{S_i}{\tan \alpha_i} + M_0(1 - E_1)E_2 \quad (1.34)$$

$T_1$  est ensuite facilement calculé à partir de la pente  $m = E_1$  par

$$T_1 = -\frac{TR}{\ln(E_1)} \quad (1.35)$$

Deux points au minimum sont donc nécessaires pour quantifier  $T_1$ . Comme il est décrit plus loin, la mesure de  $T_1$  du parenchyme pulmonaire du rat dans notre étude a été faite à l'aide de cette méthode VFA car, en plus d'être rapide, elle permet d'être relativement peu sensible aux mouvements.

### 1.3.3.2 Mesure de $T_2^*$

La décroissance apparente du signal après une impulsion est caractérisée par le temps de relaxation  $T_2^*$ . En plus des effets de relaxation spin-spin caractérisé par le temps  $T_2$ , en pratique le champ magnétique n'est pas homogène localement dans le volume de mesure (équivalent au voxel d'imagerie). Les inhomogénéités du champ magnétique proviennent principalement des différences de susceptibilité magnétique entre les tissus ou entre l'air et les tissus. Les inhomogénéités du champ statique induisent une dispersion de fréquence de résonance dans le voxel, et  $1/T_2^*$  reflète donc la gamme de fréquence de résonance. D'autres aspects peuvent également influencer la relaxation apparente comme le décalage chimique et les gradients appliqués pour réaliser le codage spatial (22 - Chavhan 2009). Le temps de relaxation  $T_2^*$  peut être mesurée avec une séquence en écho de gradient en échantillonnant plusieurs temps d'écho. L'évolution du signal est modélisée par une décroissance exponentielle en fonction de TE :

$$S(TE) = S_0 \exp\left(-\frac{TE}{T_2^*}\right) \quad (1.36)$$

Un ajustement des multiples temps d'écho TE échantillonnés permet ensuite d'estimer  $T_2^*$ . Par exemple,  $T_2^*$  peut être facilement calculé à partir de 2 acquisitions à TE court et long ( $TE_1, TE_2$ ) :

$$T_2^* = \frac{TE_2 - TE_1}{\ln(S(TE_1)/S(TE_2))} \quad (1.37)$$

Si un nombre de TE supérieur à 2 est utilisé, il s'agit, encore une fois, d'ajuster le signal mesuré au modèle, par exemple au sens des moindres carrés.

### 1.3.3.3 Mesure de $T_2$

Pour compenser l'atténuation du signal résultant des inhomogénéités du champ statique, on utilise un écho de spin (Figure 1.7a). Cette séquence est composée d'une impulsion  $\pi/2$ , suivie par un temps d'évolution  $T_{CP}/2$  ( $T_{CP}$  temps inter-échos) puis par une impulsion de refocalisation  $\pi$ . Une partie des déphasages accumulés lors du premier temps d'évolution peuvent alors se compenser pour un temps d'évolution identique égal à  $T_{CP}/2$ . Un écho de spin (ou écho de Hahn) se forme alors à  $TE = T_{CP}$ , en caractérisant un temps  $T_{2\text{ Hahn}}$ . Le signal est uniquement influencé par  $T_2$  :

$$S(TE) = S_0 \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (1.38)$$

Plusieurs variantes existent de cette séquence, notamment la séquence CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill), qui consiste à utiliser un train d'impulsions à  $\pi$  toutes déphasées de  $90^\circ$  par rapport à l'impulsion initiale à  $\pi/2$ . Ces impulsions  $\pi$  sont séparées par un intervalle de temps égal à  $TE$ , de telle sorte qu'un écho se produit au milieu de chaque intervalle. Le signal de chaque écho suit alors une décroissance exponentielle avec un temps  $T_{2,CPMG}$ , en référence à la séquence qui a été utilisée pour la mesure. Là aussi, un ajustement de la décroissance permet de quantifier  $T_2$ .

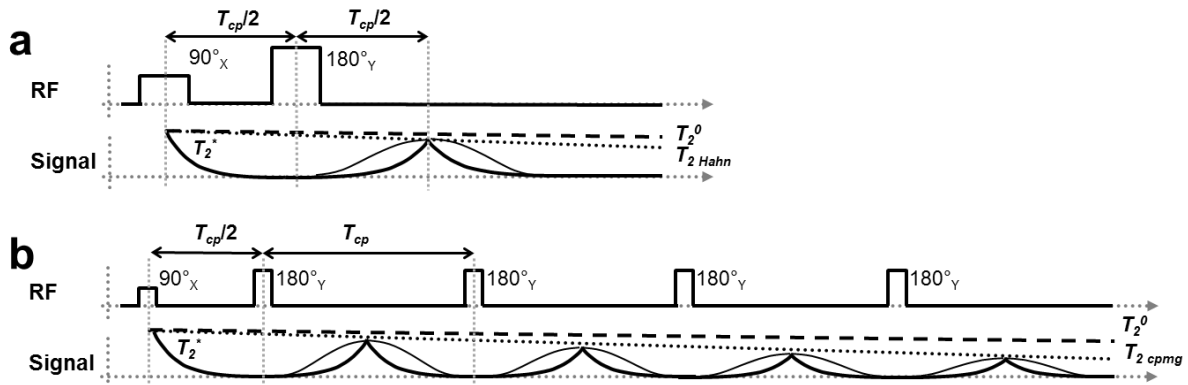


Figure 1.7. Relaxation apparente caractérisée par un temps de relaxation  $T_2^*$  plus court que  $T_2^0$  à cause des inhomogénéités du champ magnétique. Une façon de compenser ces défauts de champ est une séquence de Hahn sous forme d'écho de spins (a). Alternativement, lors d'une séquence CPMG, l'aimantation est disponible plus longtemps.

## 1.3.4 Susceptibilité magnétique

### 1.3.4.1 Définition

La susceptibilité magnétique  $\chi$  caractérise la capacité de la matière à s'aimanter sous l'action d'un champ magnétique. Elle est exprimée comme le facteur de proportionnalité entre l'excitation magnétique imposée à la matière  $\vec{H}$  et l'aimantation induite  $\vec{M}$ :

$$\vec{M} = \chi \vec{H} = \chi \vec{B}_0 / \mu_0 \quad (1.39)$$

où  $\mu_0$  est la perméabilité magnétique du vide et  $\chi$  dénote ici la susceptibilité magnétique volumique. Au début du chapitre, l'expression de la susceptibilité nucléaire a été dérivée (équation (1.7) et (1.8)), mais l'aimantation « totale » de la matière est en réalité dominée par le diamagnétisme et le paramagnétisme électronique.

Les principaux types de comportements magnétiques sont le diamagnétisme, le paramagnétisme, le superparamagnétisme et le ferromagnétisme. Lorsque la matière est diamagnétique,  $\chi$  est négative, et l'aimantation induite par le champ magnétique s'oppose à ce dernier. Le paramagnétisme est caractérisé par une valeur  $\chi$  positive, et l'aimantation est alors induite dans le sens du champ magnétique. Le superparamagnétisme consiste en une forte capacité à s'aimanter, et surtout une facilité à saturer l'aimantation. Celle-ci suit alors une fonction de Langevin et sature rapidement à une aimantation  $M_{\text{sat}}$  (23 - Jung 1995). Le ferromagnétisme est, lui, associé à une aimantation rémanente lorsque le champ magnétique appliqué est ensuite annulé. La Figure 1.8 illustre les différents comportements magnétiques de la matière.

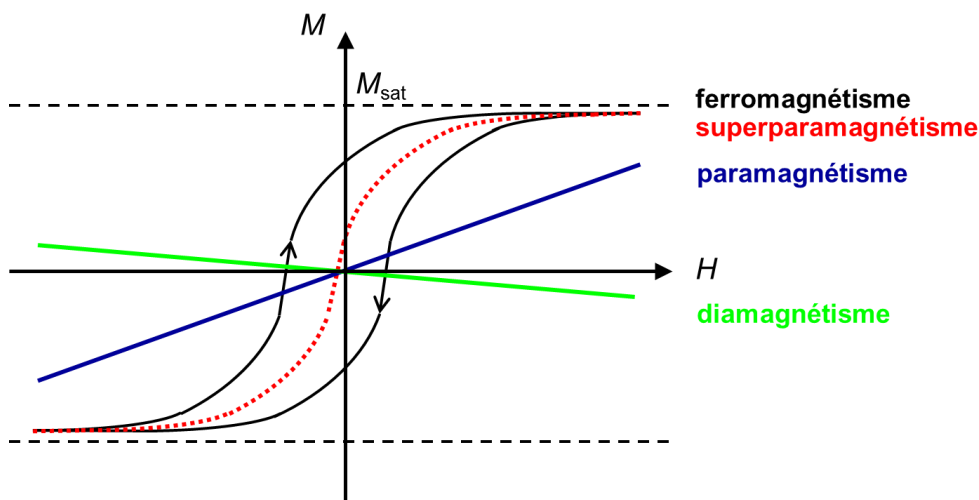


Figure 1.8. Les différents comportements magnétiques de la matière.  $M_{\text{sat}}$  est l'aimantation de saturation.

#### 1.3.4.2 Distorsion du champ et mesure par IRM

La susceptibilité magnétique est une propriété physique importante des tissus qui peut être mise à profit en IRM. Celle-ci est à la base d'inhomogénéité de champ et donc d'un contraste  $T_2^*$  et de phase dans les séquences en écho de gradients. La relation entre la distribution spatiale de la susceptibilité magnétique et le champ est complexe mais prédictible (24 - Jackson 1999). Si on considère une distribution spatiale de susceptibilité  $\chi(\vec{r})$ , on peut montrer que la composante  $Z$  du champ magnétique est déformée et donnée par :

$$B_z = B_0(1 + \chi(\vec{r}) \otimes d(\vec{r})) = B_0 + \delta B(\vec{r}) \quad (1.40)$$

où l'opération  $\otimes d(\vec{r})$  représente la convolution avec la composante  $Z$  du champ d'un dipôle

magnétique unitaire. L'effet observé est donc une déformation du champ non-locale. Pour certaines géométries simples, comme la sphère ou le cylindre infini, des expressions analytiques de la déformation spatiale du champ peuvent être obtenue (11 - Haacke 1999). Dans des cas plus complexes les déformations peuvent être calculées par éléments finis.

La fréquence du signal d'IRM est intrinsèquement une mesure du champ magnétique. Pour cartographier ce champ, une séquence en écho de gradient peut être utilisée. La phase du signal dans le repère tournant à la fréquence de Larmor est alors proportionnelle à  $\delta B(\vec{r})$ :

$$\phi(\vec{r}, TE) = -\gamma \delta B(\vec{r}) TE \quad (1.41)$$

Lors de la mesure via la phase, celle-ci étant définie modulo  $2\pi$ , une indétermination existe sur la fréquence. Si les variations de champ sont assez petites pour un TE donné pour avoir  $|\phi| < \pi$ , il existe une carte unique de phase correspondant au champ magnétique. En général, ces variations peuvent être supérieures. Il apparaît alors un phénomène de repliement. L'utilisation d'imagerie multi-échos peut réduire le nombre de repliement, ou des technique de dépliage de phase peuvent être appliquées.

L'erreur sur la mesure de phase pour un écho unique s'exprime par l'inverse du signal sur bruit (25 - Conturo 1990) :

$$\sigma_\phi = \frac{\sigma}{|S|} \quad (1.42)$$

Le bruit de phase  $\sigma_\phi$  peut être converti en erreur sur la mesure du champ :

$$\sigma_B = \frac{\sigma}{\gamma TE |S|} \quad (1.43)$$

Comme on peut le voir, il y a un intérêt à augmenter la valeur de TE pour réduire l'erreur sur la mesure du champ. A partir de la cartographie du champ, le problème inverse cherchant à estimer  $\chi$  a été proposé (26 - de Rochefort 2010). Nous avons utilisé certains de ces principes dans ce travail pour quantifier les agents de contraste modifiant la susceptibilité.

### 1.3.5 Propriétés principales et utilisation des agents de contraste

Les agents de contraste en IRM sont des molécules destinées à augmenter artificiellement le contraste et permettre d'améliorer la qualité des images. Ceux qui sont utilisés le plus couramment en IRM ont pour effet de réduire les temps de relaxation des protons environnants.

#### 1.3.5.1 *Relaxivité*

L'origine de l'effet relaxant des agents de contraste provient de la présence de spins électroniques au voisinage du spin nucléaire. En fonction de leur effet dominant sur le taux de relaxation longitudinal  $R_1 = 1/T_1$ , sur le taux de relaxation transversale  $R_2 = 1/T_2$ , ou transversale apparente  $R_2^* = 1/T_2^*$ , les agents de contraste sont classés principalement en agents  $T_1$ ,  $T_2$  ou  $T_2^*$ , respectivement. Leur capacité à

raccourcir les temps de relaxations transversal et longitudinal des protons de l'eau est mesurée par une grandeur nommée relaxivité molaire. Cette notion est exprimée en  $s^{-1}(\text{mmol/L})^{-1}$  (ou écrit en  $s^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) avec, en général, une dépendance linéaire avec la concentration de l'agent :

$$R_i = R_{i,0} + r_i C \quad (1.44)$$

où  $R_{i,0}$  est le taux de relaxation intrinsèque du tissu,  $C$  est la concentration locale de l'agent de contraste et  $r_i$  est la relaxivité longitudinale ou transversale,  $i = 1, 2$  ou  $2^*$ .

### 1.3.5.2 *Susceptibilité en présence de l'agent de contraste*

La susceptibilité magnétique des tissus est modifiée par l'addition d'agents de contraste. Pour des faibles concentrations ne modifiant pas significativement la densité, la susceptibilité peut s'exprimer proportionnellement à la concentration  $C$  et la susceptibilité molaire de l'agent  $\chi_m$  (27 - de Rochefort 2008) :

$$\chi = \chi_{\text{tissu}} + \chi_m C \quad (1.45)$$

La susceptibilité des tissus est proche de celle de l'eau  $\chi_{\text{eau}}$  égale à -9 ppm.

### 1.3.5.3 *Types d'agents de contraste*

Parmi les agents de contraste conventionnels, deux grandes catégories peuvent être distinguées, respectivement paramagnétique et superparamagnétique.

Grâce à ses propriétés paramagnétiques issues de son spin électronique de  $7/2$ , l'ion gadolinium  $\text{Gd}^{3+}$  (une terre rare) est un atome largement utilisé dans les produits de contraste IRM. Sa forme ionique libre  $\text{Gd}^{3+}$  est hautement toxique, ce qui oblige à la masquer dans des chélates (28 - Sharma 2007). Les chélates de Gadolinium sont en général des agents  $T_1$ . L'utilisation de Gd-DOTA (nom générique : gadoterate meglumine) a été retenue dans ce travail *in vitro* pour étudier la sensibilité de détection et *in vivo* pour l'imagerie du dépôt d'aérosol dans les voies aériennes.

Les agents de contraste superparamagnétiques utilisés en IRM sont à base de nanoparticules ferromagnétiques, abrégé en IONP (nanoparticules d'oxyde de fer). Elles sont généralement composées d'un cœur de nanocristaux (5 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre) d'oxyde de fer ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) entouré d'une coque biocompatible. Ces agents sont classés en SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxides) et USPIO (Ultrasmall SPIO) en fonction de leur taille. Ils permettent d'agir principalement par effet  $T_2$  et  $T_2^*$ . Leur présence induit une inhomogénéité de champ qui se traduit par une perte de signal localisée, due à un déphasage additionnel des spins. La famille de Ferumoxides a été utilisée dans l'étude *in vitro* de sensibilité de détection.

La Table 1.3 ci-dessous présente les relaxivités et les susceptibilités molaires à 1,5 T des agents de contraste utilisés dans ce travail. On notera que la susceptibilité molaire du gadolinium dépend de la



température (loi de Curie), et que l'aimantation des IONP étant quasiment saturée à 1,5 T, la valeur de susceptibilité molaire donnée est alors proportionnelle à  $\frac{M_{sat}}{B_0}$ .

Agent de contraste	$r_1$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ) à 1,5T	$r_2$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ) à 1,5T	$\chi_m$ (ppmM <sup>-1</sup> )
Gd-DOTA	3,7 <sup>a</sup>	3,5 <sup>b</sup>	310 <sup>c</sup> à 310K
IONP	10,1 <sup>d</sup>	120 <sup>d</sup>	3600 <sup>e</sup> à 1,5T

Table 1.3. Valeurs de  $r_1$ ,  $r_2$  et  $\chi_m$  pour Ga-DOTA [Dotarem®; Guerbet, Villepinte, France] et IONP [Endorem® ; Guerbet, Villepinte, France ]. Valeurs extraites de : *a.* (29 - Rohrer 2005) ; *b.* (30 - Port 2008) ; *c.* (31 - de Rochefort 2008) ; *d.* (32 - Corot 2006) ; *e.* (27 - de Rochefort 2008) mesuré à 1,5T correspondant à (23 - Jung 1995).

#### 1.3.5.4 Quel contraste utiliser ?

Les agents de contraste ont une influence sur la relaxation longitudinale, transversale et sur la fréquence de résonance. Si l'on veut détecter de manière optimale l'agent de contraste pour un temps d'acquisition donné, il faut pouvoir déterminer le paramètre qui sera le plus sensible, ce qui fixera le type de séquence à utiliser. En terme de seuil de détection, c'est le produit de la relaxivité molaire par le temps de relaxation du tissu qui doit être pris en compte (18 - Buxton 1987,33 - Girard 2011) puisque celui-ci est proportionnel au contraste. On peut alors définir le produit :

$$\beta_i = r_i T_{i,0} \quad (1.46)$$

Pour  $i = 1, 2$  ou  $2^*$ . Plus ce paramètre est élevé, plus il sera possible d'utiliser le type de contraste  $i$  avec cet agent pour le détecter dans le tissu d'intérêt. Cette expression indique que le contraste optimal (1, 2 ou  $2^*$ ) dépend des propriétés de l'agent mais également des temps de relaxation intrinsèque du tissu.

## 1.4 Méthodes d'IRM pulmonaire

### 1.4.1 Propriétés physiques des poumons pour l'IRM

L'IRM pulmonaire rencontre des challenges, principalement à cause de la densité de proton réduite, des différences de susceptibilité magnétique et des mouvements respiratoires (34 - Wild 2012).

La densité du parenchyme dans les poumons sains chez le rongeur est en moyenne proche de 0,5 g/cm<sup>3</sup> (35 - El-Khatib 1989,36 - Olsson 2007) et peut varier en fonction de l'état d'inflation des poumons (37 - Cutillo 1987). Cette densité plus faible conduit à des signaux réduits d'autant par rapport aux autres tissus. Pour obtenir un RSB acceptable, le temps d'acquisition et la taille des voxels peuvent être augmentés, cependant cela limite les applications cliniques et réduit la possibilité de détection de petite lésion.

Comme décrit plus haut, les interfaces poumon-air voient une différence de susceptibilité importante

( $\Delta\chi \sim 9$  ppm). Les inhomogénéités de champ magnétique se produisent à une échelle inférieure à la taille typique des voxels (2-5 mm) ce qui cause un déphasage rapide dans une séquence en écho de gradient. Les durée de vie du signal  $T_2^*$  sont inférieures à 2 ms à 1,5 T (mesuré en apnée) (38 - Alsop 1995), et encore plus faible lorsque le champ magnétique  $B_0$  augmente (1 ms à 3T rapporté pendant la respiration libre (39 - Yu 2011)). Ces temps courts montrent la nécessité d'avoir un TE bien plus court que ce qui est faisable avec une séquence en écho de gradient classique. Afin de mieux comprendre la décroissance de signaux RMN influencée par les hétérogénéités tissu-air dans un poumon pendant l'inspiration, des nombreux modèles mathématiques ont été proposées (40 - Cuttillo 1999). Les signaux simulés sur des modèles de mousse avec inclusions sphériques (sphères d'air comme dans les alvéoles), ont bien reproduit les résultats expérimentaux en fonction de gonflement du poumon (0% - 70% air) (41 - Case 1987).

Les mouvements respiratoires et cardiaques génèrent des artefacts en imagerie. Pour compenser ces effets, une apnée typiquement inférieure à 20 s en fin d'expiration ou en inspiration forcée est souvent réalisée. La synchronisation de l'acquisition des images avec le cycle respiratoire peut être également effectuée si des acquisitions plus longues sont nécessaires.

Dans cette partie sont présentés des séquences d'IRM du proton applicables aux poumons, ainsi que d'autres approches d'IRM utilisant des gaz avec d'autres noyaux.

## 1.4.2 Imagerie proton du parenchyme

### 1.4.2.1 Séquence classique

En utilisant des séquences classiquement utilisés sur d'autres organes, telles que l'écho de spin ou l'écho de gradient, les résultats d'imagerie sont assez décevant sur le poumon (Figure 1.9).

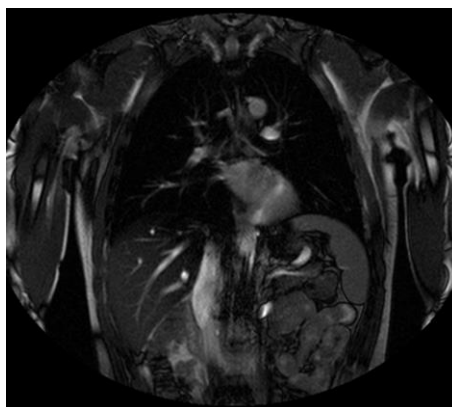


Figure 1.9. Imagerie proton conventionnelle faisant apparaître les poumons en hyposignal.

L'écho de gradient « spoiled », comme la séquence FLASH (Fast Low Angle SHot) avec un TE inférieur à 1 ms et un angle de basculement faible  $\alpha < 10^\circ$  peut être néanmoins appliquée avec quelques variante pour être sensible à la densité de proton tout en minimisant l'effet  $T_1$  (1100 -1500 ms à 1,5T). Pour obtenir un TE court en écho de gradient, un écho asymétrique et une reconstruction

partielle Fourier dans la direction de gradient de lecture avec une bande passante supérieure à 60 kHz peuvent ainsi être utilisés (34 - Wild 2012).

La séquence de précession libre à l'état stationnaire (balanced Steady State Free Precession, bSSFP), combinée avec un angle de basculement élevé ( $\sim 70^\circ$ ) et bande passante large ( $\sim 100$  kHz), refocalisant l'aimantation transversale à la fin de TR, permet une certaine imagerie pulmonaire anatomique (42 - Rajaram 2012, 43 - Bieri 2013). Une séquence bSSFP combinée avec une analyse spectrale dans le domaine fréquentiel (décomposition de Fourier) a permis d'obtenir des informations fonctionnelles sur la ventilation et la perfusion sans ajout d'agent de contraste ou de gaz (44 - Bauman 2009). Néanmoins, la séquence bSSFP est connue pour être très sensible aux effets hors-résonance provoquant des artéfacts de bande.

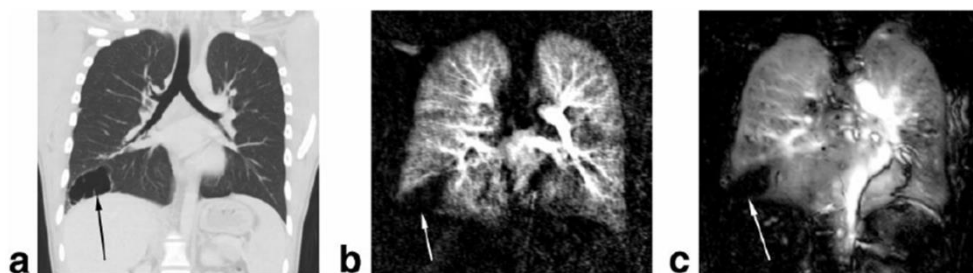


Figure 1.10. Un défaut du parenchyme avec malformation tissulaire (flèches) est détecté par CT (a), évalué par DCE-IRM (Dynamic Contrast Enhanced) (b) et avec une image pondérée en perfusion par analyse spectrale de Fourier (c). Issue de (44 - Bauman 2009).

La séquence en écho de spin rapide avec remplissage de plan de Fourier en totalité (acquisition single-shot, SSFSE) ou en partie (acquisition segmentée, Half Fourier Acquisition Single Shot Turbo Spin Echo, HASTE) (45 - Hatabu 1999, 46 - Vogt 2004) utilise des trains échos par l'application successive d'impulsions de  $180^\circ$  après une seule impulsion de  $90^\circ$ . Elle est pondérée en  $T_2$  et peu sensible au mouvement. Par contre, les trains d'échos très longs dégradent le RSB et réduisent la résolution spatiale en créant un flou dans la direction du codage de phase.

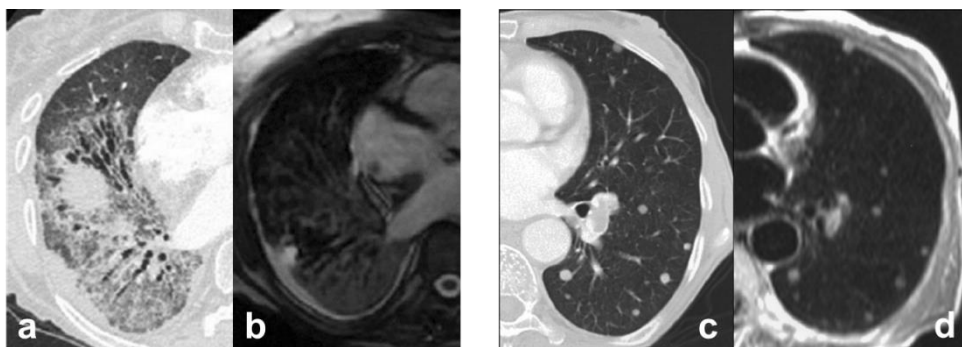


Figure 1.11. Images de tomodensitométrie (CT) (a) et d'IRM bSSFP (b) montrant les défauts fibrotiques et de bronchiectasie (affection chronique sous forme de dilatation des bronches), modifiées de (42 - Rajaram 2012). Images de CT (c) et d'IRM HASTE (d) qui montrent de petits nodules pulmonaires ( $\sim 5$  mm), issues de (46 - Vogt 2004). La taille des nodules détectables peut atteindre  $\sim 3$  mm par HASTE (45 - Hatabu 1999).

### 1.4.2.2 Séquence non-classique

Un contraste intéressant a été proposé basé sur la modification de  $T_1$  du parenchyme avec l'oxygène. Lors d'une respiration d'oxygène pur, en comparaison à de l'air, l'oxygène paramagnétique conduit à une réduction de  $T_1$  dans le sang, le plasma et le tissu pulmonaire. Ce raccourcissement de  $T_1$  rehausse le signal, ce qui peut être quantifié par des cartes paramétriques qui seront alors pondérées en ventilation/diffusion de l'oxygène. Cette technique d'imagerie rehaussé par l'oxygène peut utiliser une séquence HASTE d'inversion-récupération pour évaluer la ventilation régionale (47 - Edelman 1996) et une série de FLASH de faible angle de basculement (type Look-Locker (48 - Look 1970)) pour quantifier  $T_1$  (49 - Jakob 2001).

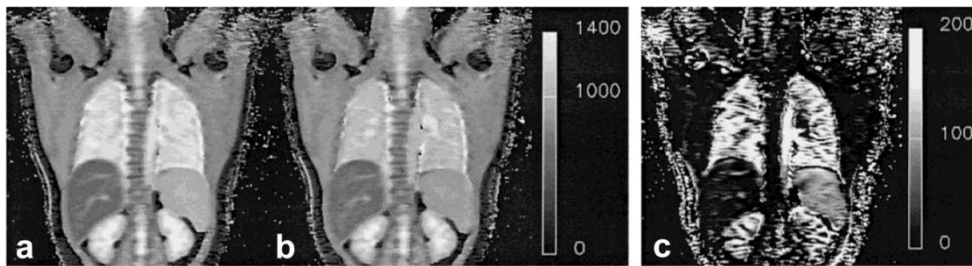


Figure 1.12. Cartes  $T_1$  calculées à partir d'une série d'images FLASH (en apnée à la fin d'expiration) pendant la respiration d'air (a) et de 100% d'O<sub>2</sub> (b). Les cartes  $T_1$  sont relativement homogènes. La différence entre les cartes (c) montre une réduction de  $T_1$  dans les poumons lors de la respiration d'oxygène à 100%, correspondant à une augmentation d'oxygène dissous dans le sang. Une réduction de  $T_1$  dans la rate est également observée. Issue de (49 - Jakob 2001)

Plus récemment, une très bonne sensibilité pour le parenchyme pulmonaire et peu d'artéfacts de mouvement respiratoire ont été obtenus grâce à la séquence à temps d'écho ultra-court (UTE) (50 - Bergin 1991, 51 - Robson 2003). Cette technique est combinée avec une acquisition radiale et permet d'obtenir un TE inférieur à 100  $\mu$ s ce qui donne accès à des signaux de durée de vie ( $T_2^*$ ) très courte. L'imagerie UTE présente donc un potentiel important pour l'imagerie pulmonaire, grâce à son contraste en densité de proton, donnant une information proche de celle obtenue par tomodensitométrie (CT) et avec ses possibilités pour détecter des lésions du parenchyme pulmonaire rarement visible avec d'autres séquences IRM.

### 1.4.3 Imagerie des gaz basée sur d'autres noyaux

#### 1.4.3.1 Gaz hyperpolarisés

Certains gaz rares comme l'hélium ( $^3\text{He}$ ) et le xénon ( $^{129}\text{Xe}$ ) peuvent être hyperpolarisés (HP) par pompage optique pour ensuite être détectable après administration dans les poumons. Cela permet d'accéder à la ventilation par la présence de signal dans les voies respiratoires et les espaces alvéolaires (52 - Goodson 2002, 10 - Moller 2002). Grâce notamment à son rapport gyromagnétique plus élevé, l'utilisation de  $^3\text{He}$  est environ dix fois plus sensible que le  $^{129}\text{Xe}$  (53 - Beckmann 2007). Leurs propriétés différentes leur permettent d'être sensibles à différents mécanismes. L' $^3\text{He}$  étant un

gaz léger et qui diffuse rapidement (coefficient de diffusion  $D \sim 2 \text{ cm}^2/\text{s}$ ), son imagerie est sensible à la géométrie des alvéoles ; tandis que  $^{129}\text{Xe}$ , qui est plus lourd, possède une solubilité élevée dans les tissus (parenchyme, globule rouge) et, ayant un nuage électronique étendu, des décalages chimiques importants sont observés permettant de différencier les phases gazeuse et tissulaire (54 - Kauczor 2009).

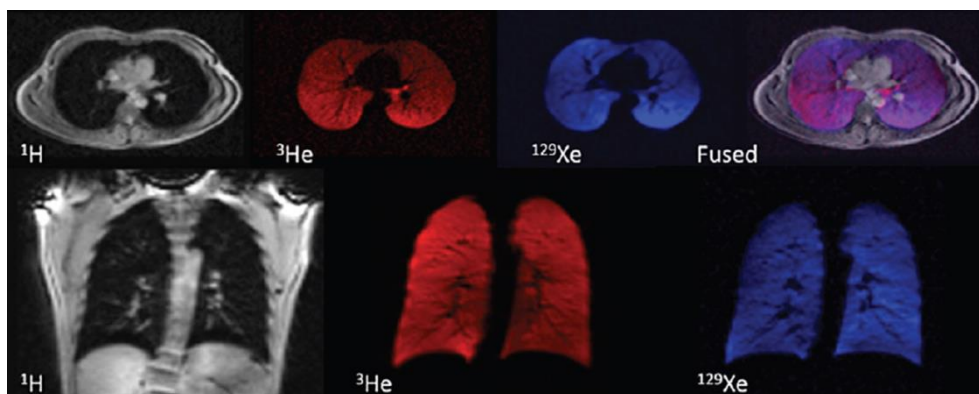


Figure 1.13. Images de  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{He}$  (rouge), et  $^{129}\text{Xe}$  (bleu) acquises chez un sujet sain pendant une inspiration d'un mélange de  $^{129}\text{Xe}$  et d' $^3\text{He}$ . Les images sont ensuite fusionnées (violet) entre l'image anatomique ( $^1\text{H}$ ) et les images de ventilation ( $^{129}\text{Xe}$  et  $^3\text{He}$ ). Issue de (55 - Wild 2013).

Les nombreuses applications biomédicales ont été proposées depuis la première image dans un poumon de souris excisé avec du  $^{129}\text{Xe}$  HP (56 - Albert 1994), puis chez animal *in vivo* avec de l' $^3\text{He}$  HP (57 - Middleton 1995). Plus récemment, le développement d'imagerie simultanée multi-noyaux laissent entrevoir la possibilité d'explorer en même temps l'anatomie et la fonction des poumons (58 - Woodhouse 2005, 55 - Wild 2013). Néanmoins, ces techniques nécessitent un système de polarisation sophistiqué et complexe à manipuler, et coûtent cher en termes de matière première (le stock d' $^3\text{He}$  sur terre est limité) ce qui restreint l'application clinique.

#### 1.4.3.2 Gaz fluoré

L'isotope naturel du fluor ( $^{19}\text{F}$ ) a une abondance de 100%. Sa fréquence de résonance est de 94 % celle du proton ( $^1\text{H}$ ) (40,05 MHz/T comparée à 42,58 MHz/T) (Table 1.1), ce qui en fait est un atome ayant une sensibilité presque aussi bonne que celle de l'eau (59 - Ruiz-Cabello 2011). L'utilisation de perfluorocarbones (PFC) a été proposée pour l'imagerie. Les PFCs sont des composés halogénés de famille des fluorocarbones (FC), composés exclusivement d'atomes de carbone et de fluor. Grâce à l'absence de signal fluor endogène, et à la faible toxicité des PFC, l'IRM de ces composés montre un rapport contraste sur bruit (RCB) élevé et une bonne spécificité. La viscosité effective et le coefficient d'étalement favorables du PFC permet d'une distribution homogène dans le poumon entier, suggérant des applications dans l'imagerie pulmonaire fonctionnelle par les gaz fluoré ventilés, tels que tétrafluorure de carbone ( $\text{CF}_4$ ), hexafluoroéthane ( $\text{C}_2\text{F}_6$ ) et hexafluorure de soufre ( $\text{SF}_6$ ), ou des PFC liquides. Les PFC liquides pourraient également être nébulisés dans les poumons pour répondre à la thématique suivie dans ce travail. Ces techniques restent à polarisation thermique, est donc nettement moins sensible que les approches hyperpolarisées, bien que plus simple et moins onéreuses à réaliser.

Un point permettant d'expliquer en partie la possibilité d'obtenir des signaux mesurables à polarisation thermique et avec des densités de phase gazeuse est la réduction drastique de  $T_1$  pour certains gaz. Concernant le  $\text{SF}_6$ , celui-ci a un  $T_1$  extrêmement court (1,81 ms à 1,5 T à 293 K), un TE court et une bande passante intermédiaire (400–500 Hz/pixel) doivent donc être pris en compte pour en réaliser l'imagerie (54 - Kauczor 2009). Ce  $T_1$  court permet une répétition très rapide et une accumulation du signal.

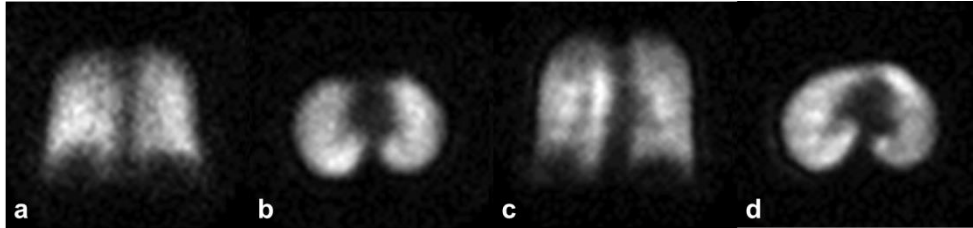


Figure 1.14. Images de gaz fluorés acquises avec une séquence 3D UTE coronales (a,c) et axiales (b,d) chez l'homme, acquise lors d'une apnée de 15 s après l'inhalation d'1 L d'un mélange de perfluoropropane PFP- $\text{O}_2$  (a-b) et après une respiration continue de 5 L d'un mélange de PFP- $\text{O}_2$  suivie d'une inhalation de 1 L d'un mélange identique (c-d). Le RSB est significativement plus élevé pour le protocole de respiration en continu (c-d). Extrait de (60 - Couch 2013).

La méthodologie d'imagerie basée sur le  $\text{SF}_6$  ont d'abord été effectuée *in vivo* chez rats (61 - Kuethe 1998) et chez cochons (62 - Schreiber 2001). Depuis, d'autres protocoles d'administration de gaz fluorés ont été développées, au moyen de ventilation alternée de  $\text{SF}_6/\text{O}_2$  100% (62 - Schreiber 2001, 63 - Perez-Sanchez 2005) et de mélange partiel de  $\text{SF}_6/\text{O}_2$  (64 - Ruiz-Cabello 2005, 65 - Wolf 2006), afin de réduire le temps d'acquisition et garder un niveau d'oxygénation du sang acceptable. Récemment, la faisabilité de l'imagerie pulmonaire chez l'homme a été démontrée à l'aide d'une séquence 3D UTE en apnée avec des gaz fluorés (60 - Couch 2013). Bien que le RSB sur les images de gaz fluoré soit beaucoup plus faible que celui de gaz HP, sa facilité d'application et son faible coût sont des points positifs pour imaginer un potentiel transfert en clinique.

## **Chapitre 2.**

# **Eléments sur la physiologie pulmonaire et les aérosols**

---

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet Oxhelease qui vise principalement à étudier sur le rat l'influence d'un mélange hélium-oxygène sur les dépôts d'aérosols et pour lequel des approches de caractérisation des dépôts par IRM ont été développées. Ce chapitre a pour but de donner les éléments de base à la compréhension des résultats obtenus dans ce travail. Des aspects anatomiques et fonctionnels sur les poumons de rats sont d'abord introduits avant de décrire les mécanismes de dépôt et de clairance des aérosols. Enfin, une revue synthétique des approches existantes de caractérisation des dépôts est proposée.

---

### ***2.1 Eléments sur le transport dans les poumons de rat***

#### **2.1.1 Le rat Wistar**

Etant facile à élever et possédant environ 90% des gènes partagés avec l'Homme, le rat est devenu, juste après la souris, l'une des espèces les plus fréquemment utilisées en expérimentation animale pour la recherche biomédicale. Une souche est définie comme un groupe d'individus dont tous les membres sont génétiquement aussi proches que possible, ce qui implique une reproduction consanguine pour 20 ou plus de générations consécutives (66 - Festing 1973). Ces populations génétiquement homogènes (lignée pure ; en anglais : inbred strain) permettent des expériences sur le rôle des gènes, tout en excluant l'influence de variabilité génétiques (67 - Zimmermann 2000). Inversement, des populations non consanguines (lignée non consanguine ; en anglais : outbred stock) sont utilisées quand un génotype identique ou proche n'est pas utile ou nuirait à l'expérience. L'élevage consiste donc à maintenir une colonie fermée pendant au moins 4 générations (68 - Gill III 1992) tout en conservant la diversité génétique. Au moins 234 souches consanguines différentes de l'espèce de Rat brun (*Rattus norvegicus*) ont été développées par sélection et/ou mutation dirigée dans des élevages.

Le *Wistar* est une souche albinos qui a été premièrement créée par croisements consanguins de Rats brun dans le Wistar Institute à partir de 1906. De nos jours, les rats Wistar forment une lignée non consanguine polyvalente utilisée dans toutes les disciplines de la recherche biomédicale. Ce rat est caractérisé par une tête large, de longues oreilles, et une queue toujours plus courte que la longueur du corps (Figure 2.1).

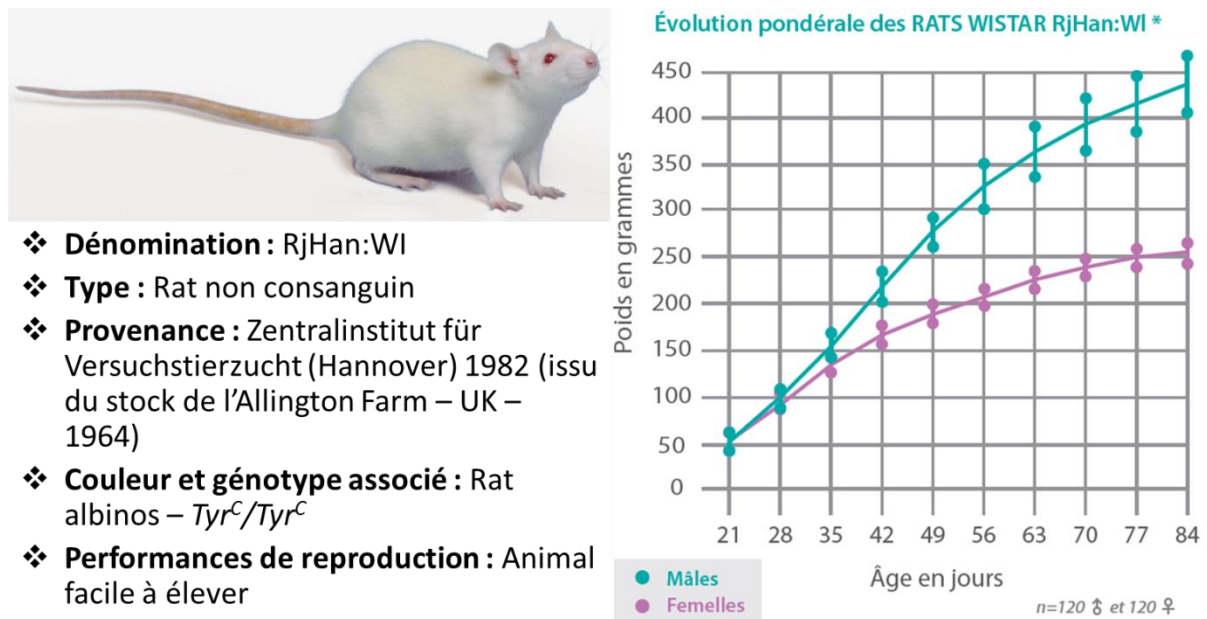


Figure 2.1: Photographie d'un rat Wistar, informations principales et évolution pondérale normale pour les mâles et les femelles (extrait du site de Janvier Labs : <http://www.janvier-labs.com/par-especes/rats-non-consanguins/product/wistar.html>). Abréviation :  $Tyr^c$  dénote le génotype de tyrosinase allèles albinos.

En ce qui concerne les maladies abordées dans ce travail, l'asthme et l'emphysème, le rat Wistar a été retenu car il possède une sensibilité suffisante permettant d'induire ces maladies respiratoires rapidement (69 - Rubio 1998, 70 - Li 2011) et d'effectuer leur suivi longitudinal. Une durée de développement de l'ordre de 10 semaines est nécessaire pour que les modèles atteignent un stade pathologique, comme il sera précisé plus loin. La Figure 2.1 présente l'évolution pondérale chez les rats Wistar sains, mâles et femelles. Comme on peut le voir, les femelles grossissent moins vite et leur poids sature à environ 250 g. Concernant la sensibilité aux produits chimiques induisant l'asthme et l'emphysème, elle pourrait dépendre du sexe et des hormones sexuelles (71 - Carey 2007) ; cependant mâles ou femelles développés lors de ce travail montraient une sensibilité comparable et peuvent être donc utilisées indifféremment comme modèle.

### 2.1.2 Anatomie et fonction des voies aériennes

L'appareil respiratoire des mammifères permet les échanges gazeux entre le sang et l'air ambiant en fournissant l'oxygène  $O_2$  nécessaire à la respiration cellulaire et en évacuant le dioxyde de carbone  $CO_2$  qui en résulte. Il a également un rôle d'humidification et de réchauffement de l'air inspiré et de filtrage des poussières et d'une partie des microbes en suspension dans l'air. D'une manière similaire, l'air expiré est refroidi et asséché, de sorte que la perte de chaleur et d'humidité est réduite pendant l'expiration. Les différentes parties anatomiques sont décrites avant d'introduire des aspects fonctionnels pulmonaires. Enfin, les modifications résultantes de l'asthme et l'emphysème seront décrites.



### 2.1.2.1 Anatomie de l'appareil respiratoire

Les voies aériennes respiratoires désignent l'ensemble des conduits qui permettent l'entrée et la sortie du gaz dans les poumons. Elles peuvent être classées en voies extrathoraciques et intrathoraciques.

#### 2.1.2.1.1 La région extrathoracique

La région extrathoracique est composée par les voies aériennes supérieures, correspondant à l'ensemble des conduits permettant à l'air d'accéder aux poumons : respectivement le nez et la bouche, les naso- et oro- pharynx, et enfin le larynx où se séparent les voies respiratoires et digestives (Figure 2.2).

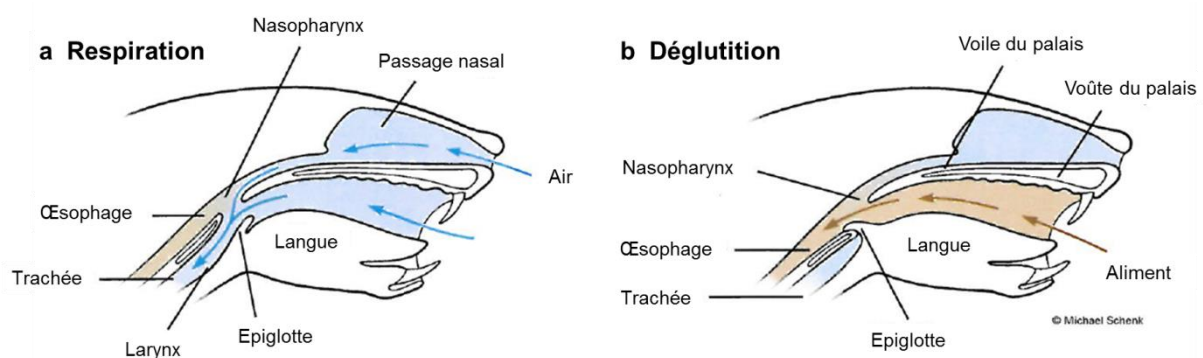


Figure 2.2: Illustration des mécanismes de respiration (a) et de déglutition (b) chez les rats. Adaptée de (72 - Schenk 2001).

##### 2.1.2.1.1.1 Les cavités nasales

Dans les cavités nasales des mammifères, de minces lames osseuses, fixées latéralement à la paroi, s'enroulent sur elles-mêmes et forment les cornets nasaux. Ces cornets sont richement vascularisés et ramifiés chez les rats. Cette ramification importante des cornets nasaux chez le rat augmente la surface de contact de la muqueuse nasale avec l'air ambiant (environ  $13 \text{ cm}^2$  de surface dans un volume de  $0,25 \text{ cm}^3$  de cavité nasale (73 - Gross 1982)), ce qui explique notamment leur odorat développé. En raison de la position rapprochée de l'épiglotte au voile du palais, le rat respire préférentiellement par le nez. La paroi de l'épithélium nasal est couverte par des vibrisses fins et du mucus y adhérent. Ceci permet la capture de particules étrangères pour éviter leur passage dans les poumons. En particulier, les cornets maxillaires des voies nasales antérieures contribuent à un filtrage et une absorption efficaces des polluants de l'air (74 - Morgan 1991), et ce de manière plus efficace que le nez humain (75 - Phalen 2009). Les caractéristiques des particules filtrées à ce niveau, notamment leur taille, seront vues plus loin.

##### 2.1.2.1.1.2 Le pharynx et le larynx

Le pharynx est le carrefour entre les voies aériennes et digestives. C'est un tube musculomembraneux d'environ 2,2 cm de longueur connectant les voies nasales et laryngées pendant la respiration. Le rat

possède une courbure faible au niveau de nasopharynx. Le larynx, quant à lui, est dans le prolongement de la cavité buccale (entre le pharynx et la trachée), entouré par du cartilage et relié par des ligaments et des muscles. Le larynx est long d'environ 0,4 cm et a une section transversale descendant jusqu'à  $0,02 \text{ cm}^2$  (76 - Schreider 1981). Par conséquent, c'est un élément résistif important du flux d'air et un facteur de création de turbulences, ce qui augmente potentiellement les dépôts de particules inhalées à la fois dans le larynx et la trachée (77 - Schulz 2000).

#### 2.1.2.1.2 La région intrathoracique

La région intrathoracique est composée d'une zone de conduction de l'air (trachée, bronches et bronchioles), et d'une zone respiratoire (conduits et sacs alvéolaires, alvéoles) en tant que telle où s'effectuent les échanges au niveau des alvéoles pulmonaires par diffusion. Entre les deux, on peut distinguer une zone de transition (bronchioles terminales et acinus de premières générations). La région intrathoracique est maintenue en place et protégée par la cage thoracique, enceinte fermée par le diaphragme en sa partie inférieure et par des os mobiles reliés entre eux par des muscles (colonne vertébrale, côtes, clavicules et sternum).

##### 2.1.2.1.2.1 La trachée

La trachée est le conduit élastique fibro-cartilagineux reliant le larynx aux bronches. Elle est environ 3,3 cm de longueur et  $0,3 \times 0,15 \text{ cm}^2$  de section transversale (77 - Schulz 2000). Elle est maintenue ouverte par une vingtaine d'anneaux de cartilage en forme de «U» rigide et flexible ce qui permet de conduire l'air en inspiration comme en expiration. Elle possède néanmoins une membrane déformable qui s'adapte au flux d'air. Histologiquement, elle est constituée d'un épithélium fait de cellules sécréteuses (40%) et de cellules ciliées (40%), ainsi que de cellules basales sous-jacentes (13%) (77 - Schulz 2000). La constitution épithéliale montre des différences significatives sur la fraction de cellules sécréteuses et basales entre les espèces de rat et humaine (78 - Mercer 1994).

##### 2.1.2.1.2.2 Les bronches

Les bronches sont des conduits amenant l'air de la trachée dans les poumons. Deux bronches souches se séparent au hile (la base de la trachée), chacune plongeant dans le poumon droit ou gauche. La surface interne des bronches est recouverte par un tapis de cils vibratiles et de mucus (79 - Alexander 1975) permettant de filtrer et rejeter à l'extérieur les principales poussières et débris cellulaires. Elles se subdivisent dans les poumons par de nombreuses ramifications : d'abord bronches, suivies par bronches lobaires, segmentaires et sub-segmentaires, puis bronchioles après un certain nombre de divisions. Les bronchioles distales fines non-respiratoires sont nommées bronchioles terminales et se terminent par des sacs pleins d'air appelés alvéoles pulmonaires (77 - Schulz 2000).

##### 2.1.2.1.2.3 La région tracheobronchiale

Contrairement au poumon humain qui montre un système se divisant quasi-symétriquement et de

manière dichotomique, la région trachéobronchiale chez le rat possède un modèle d'embranchement monopodial (un seul tronc) avec des divisions bronchiques de diamètre inégal à chaque bifurcation (80 - Yeh 1979). Chacune des ~2500 bronchioles terminales est atteinte après une moyenne de 15 bifurcations. D'après les mesures de l'architecture de la région tracheobronchiale du poumon chez le rat Long-Evans, un modèle de l'évolution des longueurs typique a pu être établi (Typical Path Lung Model). Celui-ci a pu être utilisé pour estimer le volume cumulatif de voies aériennes conductrices (de la trachée aux bronchioles terminales) à  $1,2 \text{ cm}^3$  (80 - Yeh 1979). A partir du modèle de Weibel (81 - Weibel 1963), et avec l'aide de la tomодensitométrie pour caractériser l'évolution des paramètres géométriques des voies aériennes a pu être montré que la longueur et le diamètre, ainsi que l'asymétrie des diamètres étaient liés à l'âge (82 - Lee 2011).

#### 2.1.2.1.2.4 Les alvéoles pulmonaires

Ce sont de petits sacs remplis d'air et présentant une paroi très fine ( $< 0,5 \mu\text{m}$ ), recouverte de nombreux capillaires, au niveau de laquelle a lieu les échanges gazeux par gradient de concentration entre les gaz alvéolaires et dissous dans le sang. Les nombreuses alvéoles (environ  $3 \times 10^7$ ) entre 50 et  $80 \mu\text{m}$  de diamètre se gonflent d'air à l'inspiration et se vide lors de l'expiration. Elles représentent une surface d'échange importante d'environ  $5000 \text{ cm}^2$  chez le rat. Par ailleurs, des macrophages peuvent endocyter et lyser poussières et microbes dans cette région.

#### 2.1.2.1.2.5 Poumons et parenchyme pulmonaire

Les poumons peuvent contenir en tout environ 12 mL d'air chez rat Wistar de 300g (83 - Dormans 1989). Chaque poumon constitue une masse présentant deux faces (la face latérale ou costale et la face médiale ou médiastinale), deux bords (dorsal et ventral) et deux extrémités (l'extrémité crâniale ou apex et l'extrémité caudale ou base). Le poumon est découpé en lobes par des scissures interlobaires. Chaque lobe est organisé autour d'une bronche lobaire propre. Les scissures interlobaires sont extrêmement profondes chez les rats dont le rachis thoracique présente une grande souplesse. Les poumons de rat se séparent en 5 lobes au total (Figure 2.3). Son poumon droit, le plus volumineux, est typiquement divisé en quatre lobes (un lobe crânial, un lobe moyen, un lobe caudal et un lobe accessoire (72 - Schenk 2001) ou également nommés lobe apical, lobe intermédiaire, lobe diaphragmatique, lobe cardiaque (84 - De Backer 2009)). Le poumon gauche n'est constitué que d'un seul lobe : le lobe apical ou diaphragmatique gauche.

La surface extérieure des poumons est tapissée par une mince membrane, la plèvre qui fait office d'interface avec le thorax. Celle-ci présente deux feuillets entre lesquels s'intercale un liquide présent en petite quantité et qui permet aux deux feuillets, et donc aux poumons, de glisser dans la cage thoracique lors de l'inspiration et de l'expiration.

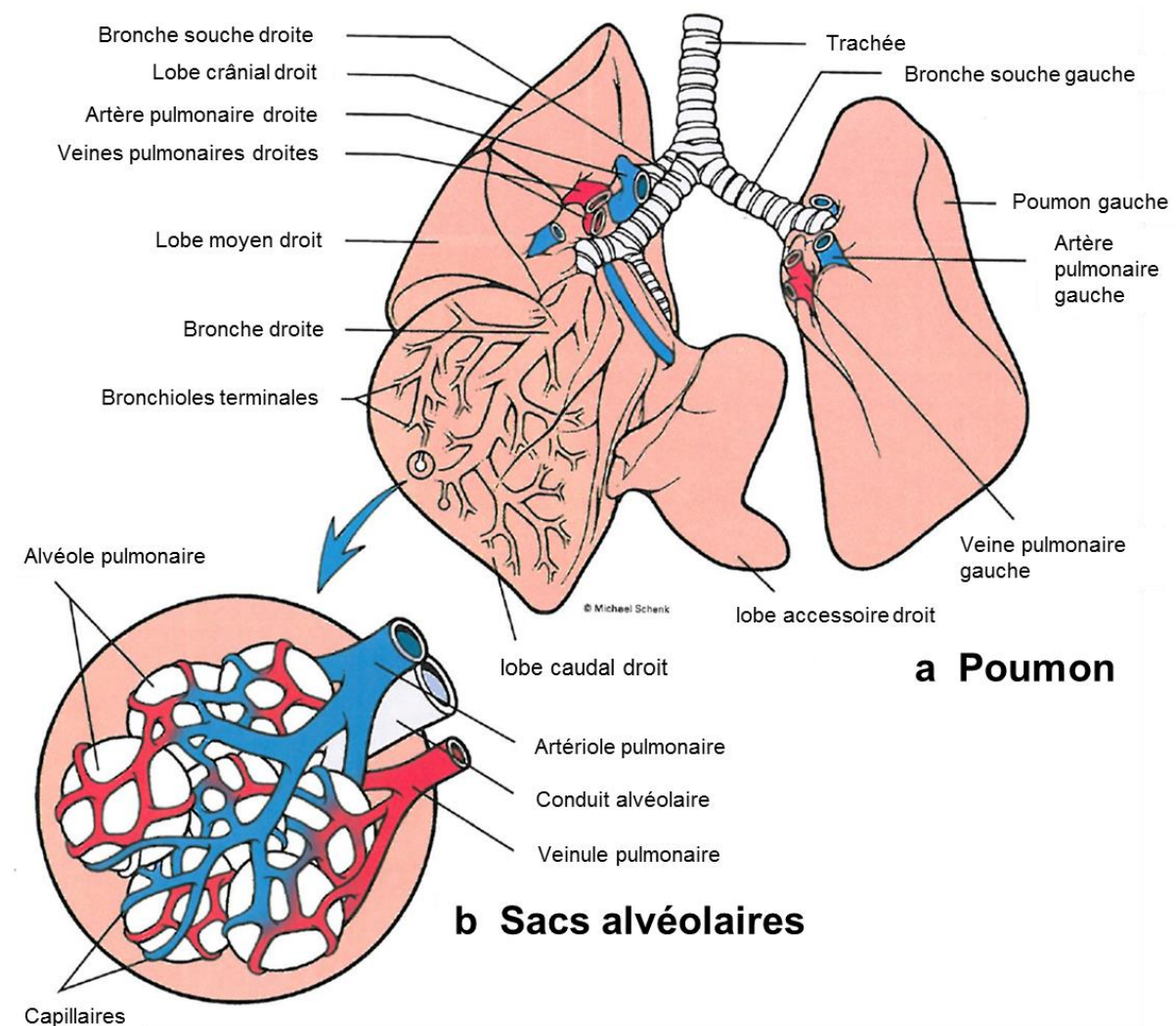


Figure 2.3: Illustration des poumons de rats (a) montrant les détails de sacs alvéolaires (b) et les dénominations des lobes. Adaptée de (72 - Schenk 2001).

D'une manière générale en physiologie, on appelle « parenchyme » l'ensemble des tissus permettant d'assurer la fonction d'un organe. On inclut dans le parenchyme pulmonaire les tissus correspondant aux bronchioles respiratoires, conduits alvéolaires et alvéoles, mais aussi aux capillaires sanguins en excluant les gros vaisseaux. Etant donné que le volume d'air varie dans les poumons, la densité du parenchyme varie au cours d'un cycle respiratoire. Une valeur moyenne d'environ  $0,5 \text{ g/cm}^3$  peut donc être estimée au repos (35 - El-Khatib 1989).

#### 2.1.2.1.3 Poumons de rat comparé à l'homme

La géométrie des voies aériennes, le profil respiratoire et les conditions de ventilation influencent les dépôts de particules et doivent être pris en compte pour étudier et comprendre les dépôts dans les poumons. Le modèle de Weibel (81 - Weibel 1963) est une référence incontournable pour décrire synthétiquement la géométrie des voies aériennes humaines. Pour le rat, un modèle de référence a été proposé par Schum et Yeh (80 - Yeh 1979,85 - Schum 1980). Le nombre de générations dans les voies

aériennes des deux espèces est similaire, mais les tailles et le nombre de voies aériennes dans chaque génération diffère de manière importante. Le diamètre de chaque voie aérienne individuel décroît en fonction du niveau de bifurcation bronchique, mais leur nombre augmente ce qui résulte en une augmentation de la section cumulée en fonction de la profondeur dans les poumons. La Figure 2.4 illustre ce phénomène en utilisant les valeurs moyennes de la taille des voies aériennes en fonction de leur génération basée sur le modèle de Weibel chez le rat. Le diamètre est environ 3,3 mm à la trachée et décroît à 0,35 mm dans les générations distales ; la longueur des segments décroît également avec une tendance identique (86 - Lee 2008).

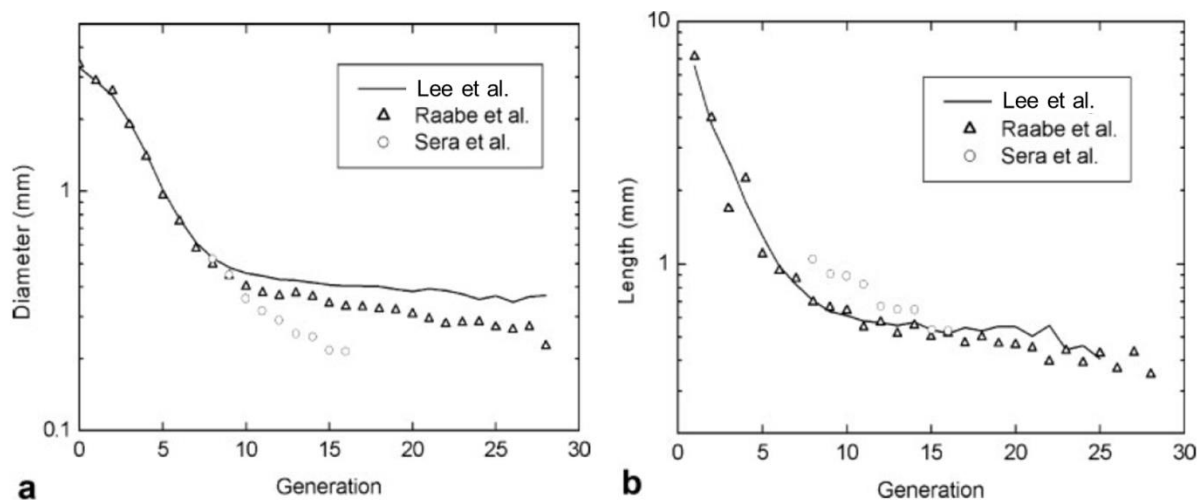


Figure 2.4. Evolution du diamètre moyen et de la longueur moyenne des voies aériennes en fonction de la génération chez le rat. Extrait de (86 - Lee 2008), dans lequel la comparaison était faite avec les données de (87 - Raabe 1976) et (88 - Sera 2003).

La Table 2.1 récapitule quelques paramètres anatomiques et physiologiques pour ces deux espèces. Il est à noter que les macrophages alvéolaires (AM) sont les principales cellules phagocytaires des voies respiratoires distales, qui servent principalement à endocyter les particules inhalées et les éliminer *via* la voie muco-ciliaire (voir chapitre 2.2.6), et pourraient participer au développement de l'emphysème ou de la fibrose interstitielle (89 - Bowden 1984). Le nombre et le volume des macrophages alvéolaires est environ deux ordres de grandeurs supérieur pour l'homme par rapport au rat (90 - Dethloff 1987).

En considérant la taille respective des deux espèces, l'homme possède des voies aériennes beaucoup plus larges, environ 500 fois plus élevées que celles du rat. En revanche, la surface des poumons entre les deux espèces varie uniquement d'un facteur  $\sim 100$ . Il y a également une différence importante concernant les conditions de ventilation. Bien que l'homme ait un volume courant beaucoup plus élevé, combiné avec une faible fréquence respiratoire, sa ventilation par minute n'a qu'un facteur 30 d'augmentation par rapport au rat.

Paramètres	Humain	Rat	Humain/Rat
Poids corporel (kg)	70	0,3	233
Poids de poumon (g)	$10^3$	1,48	676
Volume de voies aériennes (mL)	$3,2 \times 10^3$	6,5	492
Aire des voies aériennes (cm <sup>2</sup> )	$6,27 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	114
Nombre de génération	23 <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup> – 28 <sup>c</sup>	~1
Diamètre moyen des alvéoles (mm)	0,2 <sup>d</sup>	0,086 <sup>b</sup>	2,3
Nombre de bronchioles terminales	26000 – 32000 <sup>e</sup>	2487 <sup>b</sup>	10 - 13
Nombre de macrophages alvéolaires (AM)	$7 \times 10^9$	$2,6 \times 10^7$	269
Volume AM unique (μm <sup>3</sup> )	$2,5 \times 10^3$	$10^3$	2,5
Volume total d'AM (mm <sup>3</sup> )	$1,75 \times 10^4$	26	673
Volume courant (mL)	$5 \times 10^2$	2,74	182
Fréquence respiratoire (min <sup>-1</sup> )	14	98	0,14
Ventilation par minute (mL/min)	$7 \times 10^3$	$2,68 \times 10^2$	26

Table 2.1. Comparaison de paramètres anatomiques et physiologiques entre hommes et rats. *a.* (81 - Weibel 1963) ; *b.* (80 - Yeh 1979) ; *c.* (86 - Lee 2008) ; *d.* (91 - Ochs 2004) ; *e.* (92 - Haefeli-Bleuer 1988,93 - Tawhai 2000) ; les autres données sont extraits de (94 - McCunney 1996).

### 2.1.2.2 Fonction de l'appareil respiratoire

La fonction principale de l'appareil respiratoire est d'assurer les échanges gazeux. Celle-ci implique la ventilation (renouvellement de l'oxygène alvéolaire) et la perfusion (le sang atteignant la région alvéolaire). Sans rentrer dans les détails, les différents volumes pulmonaires impliqués dans la mécanique ventilatoire sont définis ainsi que les modes de transport de l'oxygène.

#### 2.1.2.2.1 La mécanique ventilatoire et les volumes pulmonaires

Les changements de volume de la cage thoracique permettent la circulation et le renouvellement de l'air à l'intérieur des poumons. L'inspiration est due à l'augmentation du volume de la cage thoracique, ce qui entraîne une dépression et un appel d'air dans les poumons. Des muscles vont intervenir dans cette phase inspiratoire. Le muscle inspiratoire principal est le diaphragme, muscle plat séparant le thorax de l'abdomen. Il assure à lui seul la mobilisation des trois quarts environ de l'air inspiré lors d'une respiration au repos. Sa contraction permet un élargissement du thorax dans ses 3 dimensions et favorise la ventilation de la partie basale des poumons. Les autres muscles inspiratoires sont les intercostaux, le petit dentelé, les scalènes. Ils permettent plutôt une ventilation thoracique haute, moins efficace. L'inspiration est donc une phase active.

A l'inverse, l'expiration normale est liée au simple relâchement des muscles inspiratoires. L'élasticité de la cage thoracique et des poumons ramène l'ensemble à sa position initiale. L'expiration est une phase passive pour un individu au repos. Elle devient active pour la respiration à l'effort et l'expiration forcée où les muscles abdominaux se contractent et jouent un rôle actif.

Lors d'un cycle respiratoire au repos, les volumes pulmonaires varient. La capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) correspond au volume d'air contenu dans les poumons à la fin de l'expiration qui est augmentée du volume courant (VC) en fin d'inspiration. L'inspiration forcée permet d'obtenir la capacité pulmonaire totale (CPT) et l'expiration forcée d'atteindre le volume résiduel (VR). Entre ces différents volumes de référence, on peut définir les volumes de réserve inspiratoires (VRI) et expiratoires (VRE), les capacités inspiratoire (CI) et vitale (CV) tels que synthétisé sur la Figure 2.5. La Table 2.2 rapporte des valeurs de la littérature pour ces différents paramètres chez le rat. La reproductibilité de mesure de volume pulmonaire intra-animal et intra-groupe effectués à l'intervalle de jour ou de semaine a été jugée acceptable (95 - Wright 1997). En revanche, la variabilité inter-individu et inter-observateur est importante. Certaine variabilité est reliée aux différences biologiques, tels que le sexe, l'âge et le poids, mais il est aussi à cause de différences dans les conditions de mesure. Les maladies pulmonaires sont typiquement associées à des modifications de paramètres respiratoires, notamment les lésions dégénératives ou emphysémateuses se traduisent par des volumes augmentés. De manière similaire, les volumes respiratoires augmentent dans les maladies obstructives par piégeage de gaz dans les régions obstruées.

On notera que dans le volume résiduel, on distingue l'espace mort anatomique qui correspond au volume qui ne participe pas aux échanges gazeux, excluant donc les alvéoles. Le rôle de l'espace mort est cependant fondamental car il a un effet tampon pour permettre la dilution de l'air extérieur.

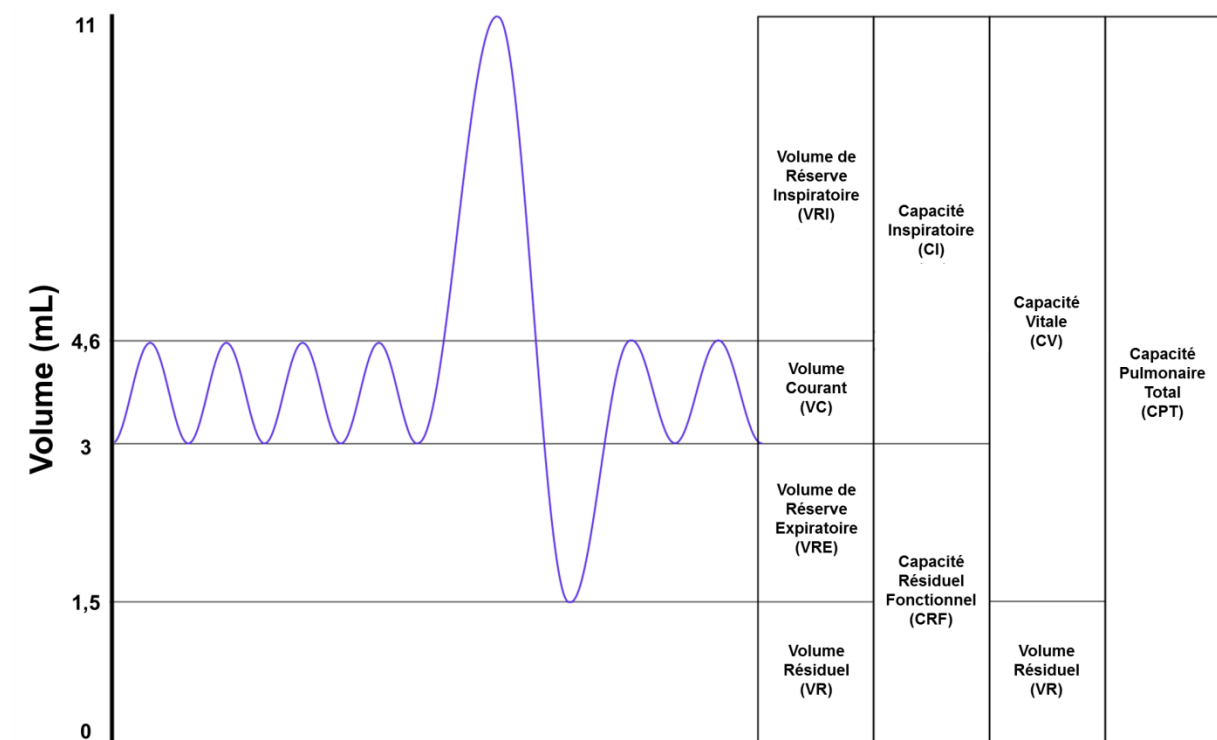


Figure 2.5. Les volumes pulmonaires pendant la respiration, et valeurs typique chez le rat.

Paramètre	Moyenne	Gamme de variation	Wistar <sup>b</sup>
CPT (mL) <sup>a</sup>	11	8,2 – 12,2	11,3 ± 1,4
CPT/masse (mL/kg) <sup>a</sup>	42	36 – 54	33
CV (mL) <sup>a</sup>	9,5	5,5 – 11	8,4 ± 1,7
CRF (mL) <sup>a</sup>	3,0	2,1 – 4,6	3,9 ± 0,8
VR (mL) <sup>a</sup>	1,5	1,0 – 2,7	2,9 ± 1,0
Compliance de poumon (mL/cm H <sub>2</sub> O) <sup>a</sup>	0,6	0,3 – 0,9	0,61 ± 0,16
Résistance de poumon (cm H <sub>2</sub> O/ mL·s) <sup>a</sup>	0,3	0,1 – 0,55	
VC (mL)	1,7	1,2 – 2,5	
<i>f</i> (respirations/min)	110	100 – 140	
ventilation par min/masse (mL/min/kg)	575	460 – 900	
VC (mL) <sup>a</sup>	1,6	1,1- 2,5	
<i>f</i> (respirations/min) <sup>a</sup>	85	30 – 130	
consommation d'O <sub>2</sub> /masse (mL O <sub>2</sub> /min/kg) <sup>a,*</sup>	18	12,0 – 21,5	

Table 2.2. Résumé de quelques paramètres fonctionnels des poumons de rat. *a*. Mesures effectués sur les animaux anesthésiés. Données extraites de (77 - Schulz 2000). *b* : extrait de (96 - Yokoyama 1983) sur des rats Wistar mâles de 338 ± 27 g positionnés sur le ventre sous anesthésie. *f* : fréquence respiratoire. \* consommation d'oxygène standardisée à la température standard (0 °C), pression au niveau de la mer (101,3 kPa) et gaz sec.

La ventilation par minute est définie comme le volume d'air inspiré ou expiré dans les poumons par minute. Elle peut être mesurée par la technique de pléthysmographie corps entier ou calculée par la multiplication de la fréquence respiratoire avec le volume courant. On peut également spécifiquement considérer la consommation d'O<sub>2</sub>, déterminé à partir de la différence de débit d'oxygène inspiré et expiré, et qui est directement lié à la consommation d'oxygène par l'organisme (97 - Vandewalle 2004). La Table 2.2 rapporte l'ordre de grandeur de ces paramètres ventilatoires chez le rat.

#### 2.1.2.2.2 Les mécanismes de transport gazeux

Il y a deux mécanismes majeurs pour effectuer le transport gazeux dans les voies aériennes, la convection et la diffusion (98 - Golshahi 2009). La convection consiste en un mouvement cohérent moyen du gaz et est le mécanisme principal du transport dans les voies aériennes de conduction (de gros diamètre). La diffusion moléculaire, quant à elle, représente le mécanisme principal de transport dans les voies aériennes de petites tailles (99 - Verbanck 2011).

##### 2.1.2.2.2.1 La diffusion

D'un point de vue microscopique, la diffusion du gaz peut être décrite par un modèle simplifié sur un ensemble de molécules en mouvement Brownien. En considérant le gaz comme parfait contenant *N* molécules de masse *m* dans un volume *V*, la théorie cinétique des gaz relie une grandeur macroscopique, la pression *P*<sub>0</sub>, à une grandeur microscopique, l'énergie cinétique moyenne des molécules du gaz  $mv_{rms}^2/2$ , par (100 - Hinds 2012) :



$$P_0 = \frac{Nm}{3V} v_{rms}^2 = \frac{Nk_B T}{V} \quad (2.1)$$

où  $k_B$  et  $T$  dénotent respectivement la constante de Boltzmann et la température absolue. Par conséquent un paramètre typique pour décrire les mouvements des molécules est la vitesse quadratique moyenne (root-mean-square)  $v_{rms}$ , donnée par :

$$v_{rms} = \sqrt{\frac{3k_B T}{m}} \quad (2.2)$$

Sachant que le gaz est considéré comme un ensemble de molécules qui se déplacent et se heurtent aléatoirement, la distance moyenne parcourue par une molécule entre deux collisions successives est donnée par :

$$\lambda = \frac{1}{\sqrt{2} \pi n d_p^2} \quad (2.3)$$

avec  $n = N/V$  la densité du gaz et  $d_p$  le diamètre des atomes/molécules considérés comme sphériques. On appelle  $\lambda$  le libre parcours moyen, caractérisant la distance moyenne sur laquelle le transfert de quantité de mouvement se fait. Par une définition similaire que la vitesse quadratique moyenne, la distance quadratique moyenne parcourue par une molécule en un temps  $\tau$  est donnée par (101 - Berg 1993) :

$$s_{rms} = \sqrt{6D\tau} \quad (2.4)$$

$D$  est le coefficient de diffusion, qui caractérise l'agitation thermique à une température donnée en unité de surface par seconde (unité en  $m^2/s$ ). Dans un système de deux gaz (dit binaire), le coefficient de diffusion est modifié pour prendre en compte le mélange. Celui-ci est lié à la température et à la masse molaire de deux gaz 1 et 2 (102 - Poling 2001):

$$D_{12} = \frac{3}{8nd_{12}^2} \left( \frac{k_B T}{\pi} M_{12} \right)^{1/2} \quad (2.5)$$

où  $d_{12} = (d_1 + d_2)/2$  est un diamètre moyenne défini à partir des diamètres  $d_1$  et  $d_2$ , et  $M_{12} = (M_1^{-1} + M_2^{-1})/2$  une masse molaire pondérée avec  $M_1$  et  $M_2$ . Dans le cas d'un gaz pur, le coefficient de diffusion (self-diffusion) est lui donné par :

$$D_{11} = \frac{3}{8nd_p^2} \left( \frac{k_B T}{\pi M} \right)^{1/2} \quad (2.6)$$

On peut noter que  $D_{11}$  peut être estimé par le produit de la vitesse quadratique moyenne et du libre parcours moyen (103 - Chang 2011) :

$$D_{11} \approx \frac{1}{3} \lambda v_{rms} \quad (2.7)$$

D'un point de vue macroscopique, la diffusion tend à uniformiser la concentration moyenne d'une espèce. Un gradient de concentration va donc nécessairement tendre à se réduire par diffusion. Ceci est décrit par la première loi de Fick qui lie le flux de matière  $J$  à travers une surface à la concentration moléculaire  $C$ . En une dimension (ici  $x$ ), cela s'écrit (99 - Verbanck 2011):

$$J = -D_{1i} \frac{dC}{dx} \quad (2.8)$$

En considérant le cas d'un mélange binaire dans les poumons, l'étude d'un seul gaz suffit et permet de caractériser la diffusion (104 - Chang 1980). La diffusion instantanée dans les petites voies aériennes peut être considérée par la seconde loi de Fick :

$$\frac{dC}{dt} = D_{12} \nabla^2 C \quad (2.9)$$

où  $\nabla^2$  est l'opérateur laplacien.

Typiquement, le coefficient de diffusion de l'oxygène à température ambiante (25 °C) est de l'ordre de 0,232 cm<sup>2</sup>/s. Le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'air est calculé théoriquement par 0,2195 cm<sup>2</sup>/s (à 1 atm et 37 °C) et a été mesuré expérimentalement comme 0,178 cm<sup>2</sup>/s (à 1 atm et 0 °C) (103 - Chang 2011).

#### 2.1.2.2.2 Mécanique des fluides et convection

La convection s'appuie sur une description macroscopique de l'écoulement au travers des équations de Navier-Stokes qui décrit le gaz comme un milieu continu avec sa masse volumique  $\rho$ , sa viscosité dynamique  $\mu$  et sa vitesse  $\vec{u}$  donné comme un champ vectoriel :

$$\rho \left[ \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u} \right] = \mu \nabla^2 \vec{u} - \nabla p + \rho \vec{g} \quad (2.10)$$

où  $g$  est l'accélération due à la pesanteur et  $p$  le champ de pression hydrostatique externe. Cette équation est ainsi appelée l'équation de conservation de la quantité de mouvement, qui se déduit de la relation fondamentale de la dynamique  $m\vec{a} = \sum \vec{F}$  avec  $\vec{a}$  l'accélération de fluide et  $\vec{F}$  les forces exercées. Le terme de gauche dans l'équation (2.10) correspond à la variation de la quantité de mouvement par unité de volume de molécules ; tandis que les termes de droite correspondent respectivement à la viscosité qui traduit le frottement du fluide à la déformation, aux forces de pression et aux forces de pesanteur. Les deux derniers termes de droite peuvent être réécrit comme  $-\nabla P_0$ , dénotant une pression combinée de pression externe lors de la respiration et de pression atmosphérique  $P_0 = p + \rho gh$ , avec  $h$  une hauteur relative dans la direction opposée de pesanteur. Les mouvements actifs et passifs des poumons induisent des gradients de pression pendant la respiration (105 - George 2011), ce qui entraîne l'écoulement du gaz dans les voies aériennes. La description de

l'écoulement dans les voies aériennes qui possèdent une géométrie complexe est donc difficile à prédire. Dans un modèle simplifié où l'écoulement est considéré en état stationnaire (terme gauche de l'équation (2.10) égale à 0) dans un tube cylindrique rigide, la vitesse des éléments dans cet écoulement laminaire (voir chapitre 2.2.3) a un profil parabolique et dépend de la position des éléments. En supposant que les voies aériennes sont les tubes de rayon  $r$  et de longueur  $L$ , la vitesse moyenne du gaz est donnée par (106 - Bird 1994):

$$\bar{u} = \frac{(\Delta P_0)r^2}{8\mu L} \quad (2.11)$$

où  $\Delta P_0$  est la différence de pression causée par la respiration et la pesanteur le long de sa trajectoire  $L$ .

Avec l'augmentation d'un facteur 30 de la surface cumulée des voies aériennes (77 - Schulz 2000), la différence de pression diminue largement, ainsi que la vitesse moyenne du gaz lorsque la génération bronchique augmente. La vitesse moyenne devient ensuite négligeable par rapport à la vitesse quadratique moyenne du gaz, et le transport diffusif devient dominant. Pour caractériser l'importance de transport diffusif par rapport au transport convectif du gaz, dans les différentes régions du poumon, le nombre Péclet peut être utilisé :

$$Pe = \bar{u} \frac{d}{D} \quad (2.12)$$

où  $\bar{u}$  est la vitesse convective moyenne,  $d$  le diamètre moyen de la génération bronchique et  $D$  le coefficient de diffusion. Si  $Pe$  est grand devant l'unité, la convection domine définissant les zones de conduction. Réciproquement, la diffusion domine dans les zones respiratoires (107 - Scherer 1982) qui ont un nombre de Péclet  $< 1$ . Par rapport à l'homme, l'anatomie des poumons du rat montre une répartition étendue des acini qui génère une différence sur la génération correspondant à la transition entre conduction et diffusion. En considérant les mêmes conditions de gaz et ventilation,  $Pe$  est proche de 1 dès la 4<sup>ème</sup> génération chez le rat, alors que cela arrive dans la 15<sup>ème</sup> génération chez l'homme (99 - Verbanck 2011). Toutefois, le profil respiratoire et la géométrie spécifique de voie aérienne doivent être pris en compte pour étudier le transport du gaz chez le rat.

### 2.1.3 L'asthme et l'emphysème, le modèle rat

#### 2.1.3.1 L'asthme

L'asthme est la maladie respiratoire chronique la plus courante, notamment chez l'enfant. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 300 millions de personnes souffrent de cette maladie. Plus de 80% de ces décès surviennent dans les pays en développement. En France, on dénombre encore 2 000 décès par an, malgré des thérapeutiques disponibles efficaces.

L'asthme est une maladie du système respiratoire qui affecte les voies aériennes inférieures et notamment les bronchioles. Ses symptômes incluent des épisodes d'essoufflement, d'oppression

thoracique et de toux, en particulier à l'effort, la nuit et au petit matin. Elle s'explique par trois mécanismes caractéristiques (108 - Boulet 1995, 109 - Tulic 2001, 110 - 2007) : i) une inflammation avec œdème de l'épithélium bronchique, correspondant à l'épaississement de parois bronchique dû à une accumulation de liquides ; ii) une bronchoconstriction par bronchospasmes, présentant une contraction brusque et involontaire des muscles lisses des bronches distales ; iii) une hyperactivité bronchique (contraction exagérée en réponse à un stimulus), se manifestant par une sécrétion accrue de mucus, notamment due à un remodelage des voies respiratoires supérieures. Les muscles lisses resserrés et la paroi inflammatoire épaissie rétrécissent les voies aériennes, donc limitent le débit d'air (Figure 2.6).

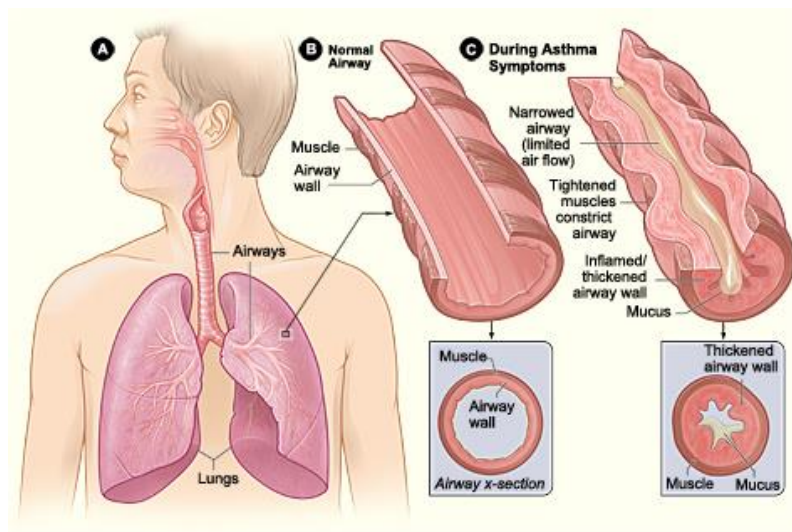


Figure 2.6. Comparaison morphologique et physiologique dans les voies intrathoraciques (A), entre les voies aériennes normales (B) et dans le cas de l'asthme (C); extrait de <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/asthma/>.

### 2.1.3.2 L'emphysème

L'emphysème correspond à une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), un groupe de maladies chroniques systémiques d'origine respiratoire et atteignant les bronches. D'une manière générale, la BPCO est la cinquième cause de mortalité dans le monde. L'OMS prévoit qu'en 2020, cette affection sera la troisième cause de mortalité par maladie dans le monde.

L'emphysème est défini par une dilatation anormale et permanente de l'espace aérien distal au niveau des bronchioles terminales (111 - Symposium 1959), associé à la destruction de la paroi des alvéoles et une fibrose (112 - Snider 1985). Cette anomalie aboutit à une perte de surface d'échange gaz-sang, une diminution de l'élasticité tissulaire, et une augmentation des volumes aériens distaux (113 - Snider 1987) (Figure 2.7). Les alvéoles plus larges transfèrent moins d'oxygène dans la circulation sanguine, ce qui induit une respiration demandant d'abord plus d'efforts puis une insuffisance respiratoire à terme. (114 - Vestbo 2013).

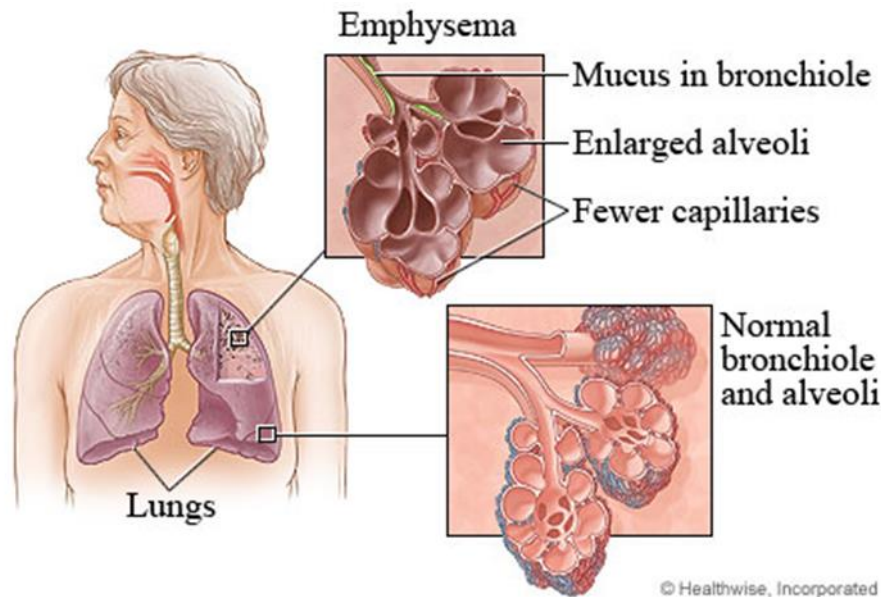


Figure 2.7. Comparaison morphologique et physiologique de tissu alvéolaire sains et emphysemateux; extrait de <http://www.webmd.com/lung/emphysema>. L'emphysème est caractérisé par des espaces alvéolaires élargis, moins de capillaires et plus de mucus dans la bronchiole.

### 2.1.3.3 Induction de l'asthme et de l'emphysème chez le rat

Différentes techniques ont été proposées pour développer des modèles d'animaux asthmatiques, qui peuvent être sensibilisé à l'ovalbumine (115 - Hylkema 2002), l'antigène utilisé le plus souvent, et les antigènes tels que les dermatophagoides, (en anglais : house dust mite) (116 - Liu 2005), antigène *Ascaris* (117 - Misawa 1987), *Aspergillus fumigatus* (118 - Mehlhop 1997) et des extraits de l'herbe à poux (119 - Fan 2006). Les procédures de sensibilisation et le challenge qui s'ensuit avec ces antigènes permettent de produire les inflammations et les réactions aiguës des voies aériennes telles que la bronchoconstriction et l'allergie (120 - Zosky 2007). Dans ce travail, une sensibilisation par injection intrapéritonéale de l'ovalbumine (121 - Raza Asim 2010) a été utilisé par nos collaborateurs. Le protocole sera décrit en détail dans le Chapitre 5.

Le modèle expérimental de l'emphysème pulmonaire est basé sur la nébulisation ou l'instillation intrapulmonaire d'enzymes protéolytiques qui détruisent la matrice extracellulaire (l'ensemble de macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif fournissant le support structural et biochimique) et les fibres élastiques (122 - Di Petta 2014). Différentes procédures protéolytiques ont été proposées, tels que l'utilisation de papaïne (*Carica papaya*) (123 - Gross 1964), d'élastase pancréatique porcine (124 - Snider 1986), et d'élastase neutrophile humaine (125 - Senior 1977). Ces protocoles, sont associés à une destruction uniforme de la matrice extracellulaire de l'acinus pulmonaire, permettent de générer des changements morphohistologiques et physiologiques dans les poumons qui ressemblent à l'emphysème chez l'homme (126 - Mahadeva 2002). Dans la présente étude, nous avons utilisé l'administration intratrachéale d'élastase pancréatique porcine. Le détail sera donné dans le Chapitre 5.

## **2.2 Éléments sur les aérosols**

### **2.2.1 Définition générale**

Dans les années 1920, August Schmauß, un météorologiste allemand, a pour la première fois introduit la notion d'aérosol comme une suspension de particules solides ou liquides dans un gaz (127 - Schmauss 1922). Les particules peuvent être de tailles et de formes diverses, de nature solide (poudre) ou liquide (gouttelettes) ou les deux. Le critère principal est de présenter une vitesse limite de chute négligeable par rapport à la vitesse de gaz porteur, en supposant que les particules sont à l'équilibre thermodynamique avec le gaz et l'interaction entre les particules est négligeable (128 - Mailliat 2012). En mécanique des fluides, un aérosol est défini comme un système diphasique formé de particules et d'un gaz porteur. En pratique, un aérosol est souvent synonyme de particules dans un milieu gazeux (129 - Boulaud 2003).

La science des aérosols, initiée comme telle dans le courant des années 1950, s'est considérablement développée durant ces vingt dernières années. Les aérosols sont présents dans de nombreux secteurs de l'industrie, de l'environnement naturel, en milieu urbain et dans le domaine de la santé. L'inhalation d'aérosols « médicaments » devient une voie d'administration attractive pour traiter des maladies respiratoires ou systémiques, grâce à ses avantages potentiels tels que son transfert rapide, non-destructif (par rapport à la voie orale) et non-invasif (par rapport à l'injection) de médicament dans la circulation sanguine (130 - Kleinstreuer 2008). Par ailleurs, les particules inhalées ( $<10\ \mu\text{m}$ ) issues de la combustion des énergies fossiles notamment, augmentent le risque de maladies pulmonaires aiguës et chroniques (131 - Heyder 2004). Ce double aspect thérapeutique et toxicologique demande une meilleure compréhension de comportement de particules dans les voies respiratoires.

### **2.2.2 Caractérisation de la taille des particules d'aérosol**

La taille des aérosols varie de particules très petites telles que dans la fumée de tabac ( $<0,1\ \mu\text{m}$ ) jusqu'aux gouttelettes de brouillard et pollens ( $>50\ \mu\text{m}$ ). Les aérosols utilisés pour le diagnostic ou comme médicament sont généralement situés dans la gamme de  $0,5$  à  $10\ \mu\text{m}$  (132 - Newman 2008). La taille, la densité et la forme des aérosols sont les caractéristiques majeures pour évaluer leur devenir dans les poumons. En particulier, la taille est un indicateur de qualité et de performance dans l'industrie ainsi qu'un paramètre majeur pour évaluer l'influence de polluants atmosphériques sur la santé. En effet, la taille des particules influence directement les propriétés de l'ensemble de l'écoulement, tels que la compressibilité, la dissolubilité et la viscosité.

#### **2.2.2.1 Diamètres équivalents**

L'aérosol « idéal » est défini comme possédant une densité standard égale à celle de l'eau ( $1,0\ \text{g/mL}$ ) et est sphérique. Dans la pratique, les particules d'aérosol pharmaceutique délivrées par un dispositif d'inhalation et les particules d'origine atmosphérique sont souvent de forme irrégulière. Pour les particules d'aérosol sphériques, un diamètre géométrique ou physique  $d_g$  est le plus simple diamètre

caractéristique. Pour les particules non-sphériques, une notion de diamètre équivalent a été définie, en considérant des particules sphériques qui possèderaient une même propriété spécifique que les particules de forme irrégulière, tels que le même volume, la même masse ou la même surface (133 - Kulkarni 2011). Le diamètre volumique équivalent est noté  $d_v$  et le diamètre massique équivalent est noté  $d_M$ . Le diamètre volumique est utile pour les particules présentant des espaces internes vides. Dans le cas de particules sphériques,  $d_v$  égale à  $d_g$  (100 - Hinds 2012).

La densité d'aérosol peut alors être caractérisée soit comme la densité de matière par le diamètre massique, soit comme la densité de particule par le diamètre volumique (134 - DeCarlo 2004). La densité de matière est définie par le rapport de la masse de la particule  $m_p$  par le volume de matière  $V_m$  :

$$\rho_m = \frac{m_p}{V_m} = \frac{m_p}{\frac{\pi}{6}d_M^3} \quad (2.13)$$

La densité volumique de la particule est définie par le rapport de la masse de particule  $m_p$  par le volume de la particule  $V_p$  contenant la matière et l'espace interne vide :

$$\rho_p = \frac{m_p}{V_p} = \frac{m_p}{\frac{\pi}{6}d_v^3} \quad (2.14)$$

En cas d'absence de vide au sein de la particule,  $\rho_m = \rho_p$ .

#### 2.2.2.2 Régime d'écoulement et facteur géométrique

La force de frottement (en anglais : drag force), exercée sur les particules par le gaz, dépend de la taille et de la forme des particules. Dans les différents régimes d'écoulement gazeux, la force de frottement moyenne est exprimée en considérant un milieu continu. Les régimes d'écoulements sont déterminés par le nombre de Knudsen (Kn), défini comme le rapport entre le libre parcours moyen du gaz  $\lambda$  et le diamètre des particules  $d_p$  (diamètre réadapté selon les cas) (134 - DeCarlo 2004):

$$Kn = \frac{2\lambda}{d_p} \quad (2.15)$$

Le gaz vecteur est considéré comme un fluide continu autour de particules dans le cas où  $Kn \ll 1$ . Si  $Kn \gg 1$ , soit si les tailles des particules sont très inférieures au libre parcours moyen du gaz (régime de molécules libres), les particules interagissent avec les molécules du gaz par collisions, et nous avons à faire à la diffusion Brownienne. Dans le régime intermédiaire de  $0,1 < Kn < 10$ , les particules sont considérées dans un régime de transition. Pour des particules micrométriques comme ce qui est utilisé dans ce travail,  $Kn \ll 1$ . La loi de Stokes donne alors la force de frottement sur la particule sphérique dans l'écoulement :

$$F_D = 3\pi \mu u_r d_g \quad (2.16)$$

avec  $\mu$  la viscosité dynamique du gaz et  $u_r$  la vitesse relative de la particule par rapport au gaz. Dans

les autres deux régimes, un facteur de correction de Cunningham  $C_c$  en fonction de  $Kn$  doit être ajouté à l'équation (2.16), pour prendre en compte la diminution du frottement par le gaz lorsque le diamètre de la particule s'approche du libre parcours moyen des molécules du gaz et la vitesse relative de gaz sur la surface de particule n'est plus nulle (134 - DeCarlo 2004).

Pour les particules non-sphériques, un facteur correctif géométrique est utilisé pour prendre en compte l'augmentation de la traînée dans l'équation (2.16). Ce facteur est nommé facteur de géométrie dynamique ( $\chi$ ) et défini comme le rapport entre la force de frottement sur la particule de forme irrégulière à celle d'une particule sphérique avec les mêmes volume et vitesse. La force de frottement pour les particules de forme irrégulière est donc approximée par (135 - Kulkarni 2011) :

$$F_D = 3\pi \mu u_T d_V \chi \quad (2.17)$$

$\chi$  est normalement supérieur à 1 pour les géométries non-sphériques et égale à 1 pour les sphères.

### 2.2.2.3 Diamètre aérodynamique

On considère le phénomène de sédimentation qui correspond à la chute de la particule sous son poids. On peut considérer un équilibre (sédimentation stationnaire) pour lequel la force due à la gravité compense la force de frottement exercée par le gaz. Alors :

$$\rho_p \frac{\pi}{6} d_V^3 g = 3\pi \mu u_T d_V \chi \quad (2.18)$$

où  $g$  dénote l'amplitude du champ de pesanteur.  $u_T$  est appelé « vitesse terminale », et correspond à la vitesse de chute de la particule :

$$u_T = \frac{\rho_p d_V^2 g}{18\mu\chi} \quad (2.19)$$

Le diamètre aérodynamique  $d_{ae}$  (AD, Aerodynamic Diameter) d'une particule ayant une masse volumique  $\rho_p$  est donc défini comme le diamètre d'une sphère ayant une masse volumique de  $1 \text{ g/cm}^3$  et la même vitesse terminale que la particule. En prenant cette définition avec  $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$  et  $\chi=1$ , la vitesse terminale (équation (2.19)) s'exprime comme :

$$u_T = \frac{\rho_0 d_{ae}^2 g}{18\mu} \quad (2.20)$$

En combinant les équations (2.19) et (2.20), le diamètre aérodynamique est donc donné par :

$$d_{ae} = d_V \sqrt{\frac{\rho_p}{\rho_0 \chi}} \quad (2.21)$$

Le diamètre aérodynamique est généralement utilisé pour caractériser le comportement cinétique de particules d'aérosol  $> 0,5 \mu\text{m}$  (136 - John 2011), et est toujours inférieur au diamètre volumique pour les particules de forme irrégulières avec une densité standard. En pratique, il peut être calculé en



prenant en compte certaines hypothèses. Si nous supposons que les particules sont sphériques ( $x = 1$ ), l'AD est simplifié (134 - DeCarlo 2004) :

$$d_{ae} = d_V \sqrt{\rho_p / \rho_0} \quad (2.22)$$

En cas d'absence de vide au sein des particules sphériques, l'AD peut être évalué à partir du diamètre volumique, en prenant en compte une densité relative de la matière (substance initiale pour générer l'aérosol) par rapport à l'eau :

$$d_{ae} = d_V \sqrt{\rho_m / \rho_0} \quad (2.23)$$

#### 2.2.2.4 *Distribution de taille de particules*

Un aérosol peut être caractérisé par la distribution de la taille des particules qui le compose et peut être monodispersif ou hétérodispersif. Un aérosol est dit « monodispersif » si toutes les particules sont approximativement de la même taille, tandis qu'il sera « hétérodispersif » si les tailles sont inhomogènes. Pour caractériser la distribution de taille, une loi log-normale est souvent utilisée (137 - Ramachandran 2011):

$$f(d) = \frac{1}{d \ln(\sigma) \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln(d) - \ln(\bar{d}))^2}{2 \ln^2(\sigma)}\right) \quad (2.24)$$

où  $\bar{d}$  et  $\sigma$  sont la moyenne et l'écart type géométrique du logarithme du diamètre de la particule  $d$ . Trois valeurs sont alors déduites pour décrire la taille de particule comme représenté sur la Figure 2.8 : i) la moyenne arithmétique ; ii) la médiane ( $d_{50}$ ) : le nombre divisant l'ensemble des valeurs en deux parties égales ; iii) le mode (la valeur dominante) : la valeur la plus fréquente de la population. Nous notons  $d_n$  pour lequel  $n\%$  de l'aérosol total est contenu dans les particules d'aérosol avec diamètre inférieur à  $d_n$ .

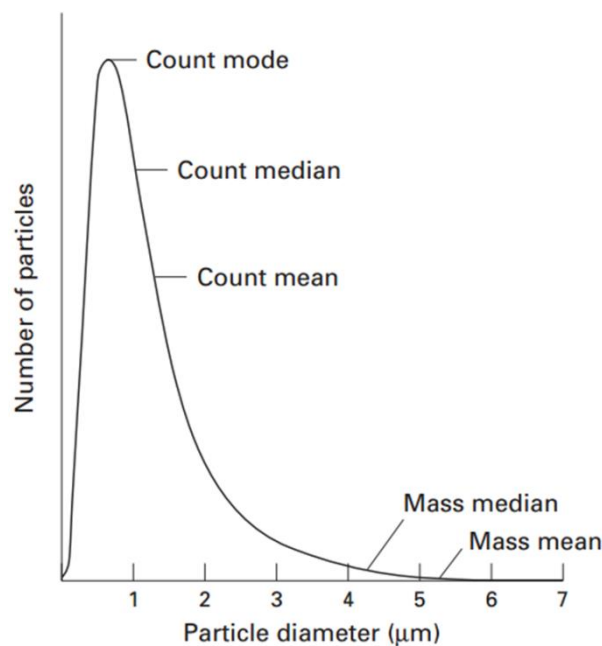


Figure 2.8. Distribution log-normale décrivant la distribution de tailles de particule et caractérisation par mode (la taille correspondant au maximum de la distribution), les moyenne/médiane en nombre de particules ou en masse cumulée. Extraite de (138 - O'Callaghan 1997).

#### 2.2.2.5 Mesure du diamètre des particules d'aérosol

Afin de caractériser les aérosols hétérodispersifs, la distribution de taille mesurée est en pratique « pondérée » par certaines propriétés spécifiques des aérosols. La moyenne  $\bar{d}$  ou la médiane  $d_{50}$  de la distribution log-normale peut ensuite être mesurée en pondérant par le nombre, le volume ou la masse, correspondant respectivement au diamètre médian sur le nombre (CMD, Count Median Diameter), au diamètre médian sur le volume (VMD, Volume Median Diameter) et au diamètre médian sur la masse (MMD, Mass Median Diameter) comme illustrée dans la Figure 2.8.

Il y a deux grandes catégories de techniques pour caractériser les tailles de particules, respectivement les méthodes optique et dynamique. En pratique, la méthode optique est basée sur la diffraction laser et la méthode dynamique est souvent basée sur l'impaction inertielle. Ces méthodes seront décrites dans le Chapitre 3. Brièvement, la méthode optique consiste à mesurer la distribution de tailles des particules par les effets de diffraction de la lumière, qui mesure VMD (139 - Mitchell 2006). La méthode d'impaction utilise des impacteurs en cascade, tels que le système Andersen Sampler ou le système Multi-Stage Liquid Impinger (MSLI), qui collecte les particules d'aérosol dans une série d'étage d'impaction, en gros des trous de différentes tailles qui filtrent l'aérosol en fonction de leur diamètre aérodynamique (140 - Mitchell 2003). Dans les études sur les dépôts d'aérosol dans les voies aériennes, le diamètre aérodynamique médian sur la masse des particules (MMAD, Mass Median Aerodynamic Diameter) est le plus souvent utilisé pour caractériser la taille d'aérosol et décrire sa cinétique (135 - Kulkarni 2011). Ce paramètre est directement déduit des caractérisations avec les impacteurs. La conversion entre VMD et MMAD peut être réalisée en prenant l'équation (2.23) en supposant des particules sphériques pleines :

$$MMAD = VMD \times (\bar{\rho})^{\frac{1}{2}} \quad (2.25)$$

où  $\bar{\rho}$  est la densité de matière normalisée à l'eau.

L'écart-type géométrique (GSD, Geometric standard deviation), qui décrit la dispersion d'une distribution de taille d'aérosol (nombre, volume ou masse) autour de la moyenne géométrique, peut être défini comme (136 - John 2011, 141 - Martin 2011) :

$$GSD = \sqrt{d_{84}/d_{16}} \quad (2.26)$$

Pour les aérosols à usage médicaux, GSD est dans la gamme de 2 à 3 ; tandis qu'une distribution de taille est considérée comme monodispersive quand GSD est inférieur à 1,22 (132 - Newman 2008).

### 2.2.3 Nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds ( $Re$ ) est un nombre sans dimension qui représente, pour un écoulement fluide, le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses :

$$Re = \frac{\bar{u}d}{\nu} = \frac{\rho\bar{u}d}{\mu} \quad (2.27)$$

avec  $\bar{u}$  la vitesse moyenne du fluide (en m/s),  $d$  la dimension caractéristique (en général le diamètre des voies aériennes), et  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide ( $m^2/s$ ). Cette dernière est le rapport  $\nu = \mu/\rho$  entre la viscosité dynamique  $\mu$  (en Pa·s) et la masse volumique du fluide.

Le nombre de Reynolds est utilisé pour caractériser le régime de l'écoulement en termes de turbulence. Trois régimes peuvent être distingués dans les poumons, respectivement régime de Stokes ( $Re \ll 1$ ) pour lequel les effets visqueux sont dominants, le régime laminaire ( $Re < 2000$ ) pour lequel le flux massique est prédominant et décrit par les équations de Navier-Stokes, et le régime turbulent ( $Re > 2300$ ) (142 - Holman 2002) pour lequel la description laminaire ne suffit plus. La valeur de 2000 correspond à un ordre de grandeur d'un nombre de Reynold critique ( $Re_{crit}$ ) qui sépare ces deux derniers régimes (143 - Avila 2011).

### 2.2.4 Mécanisme de dépôt d'aérosol

Les mécanismes principaux affectant le transport et le dépôt d'aérosol dans les poumons incluent l'impaction inertielle, la sédimentation gravitationnelle et la diffusion Brownienne qui indiquent par leur nom le mécanisme prépondérant. D'autres mécanismes moins importants peuvent aussi être responsables de dépôts, la turbulence, l'interception ou encore la précipitation électrostatique (144 - Darquenne 2012). La Figure 2.9 schématise ces mécanismes.

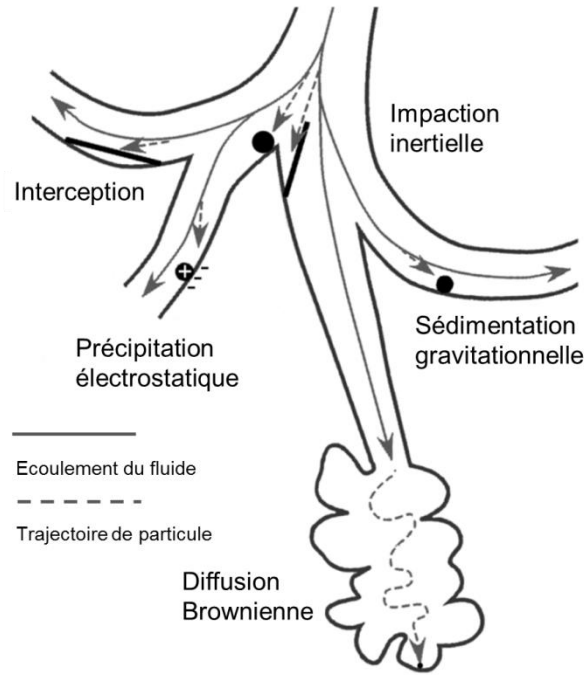


Figure 2.9. Illustration des mécanismes de dépôt de particule. Adaptée de (145 - Frohlich 2014).

#### 2.2.4.1 L'impaction inertielle

L'impaction inertielle est associée aux changements brusques de direction de l'écoulement du gaz et a lieu lorsque les particules ne sont plus capables de les suivre. En reprenant l'équation (2.20) sur la vitesse de sédimentation, un temps de relaxation de la particule peut être défini :

$$\tau = \frac{\rho_p d_p^2}{18\mu} \quad (2.28)$$

Ce paramètre caractérise la durée pour atteindre la condition d'équilibre. De plus, la distance d'arrêt peut être définie en prenant en compte cette durée et la vitesse de l'écoulement du gaz (135 - Kulkarni 2011) :

$$s = \bar{u}\tau \quad (2.29)$$

La probabilité d'impaction est donc décrite par le nombre de Stokes ( $Stk$ ), qui est le rapport entre la distance d'arrêt et la dimension caractéristique  $d$ :

$$Stk = \frac{s}{d} = \frac{\rho_p d_p^2 \bar{u}}{18\mu d} \quad (2.30)$$

où  $\rho_p$  et  $d_p$  sont la densité et le diamètre des particules ;  $\bar{u}$  et  $\mu$  sont la vitesse moyenne et la viscosité dynamique du gaz vecteur ; et  $d$  égale au diamètre des voies aériennes (ou au diamètre de la plaque d'impacteur utilisée pour la caractérisation). La probabilité de l'impaction est plus importante pour les particules ayant une plus grande masse volumique et celles transportées dans un écoulement rapide. Chaque fois que l'écoulement change de direction, la quantité de mouvement des particules tend à

conserver les trajectoires existantes, induisant la déviation des particules larges sortant de l'écoulement et venant s'impacter sur les parois bronchiques. Plus le nombre de Stokes est élevé, plus le transport inertiel est efficace et plus il est possible que les particules soient déposées par impaction inertielle. Ce mécanisme affecte principalement les particules supérieures à 5  $\mu\text{m}$  et intervient principalement dans les voies aériennes supérieures et aux bifurcations (144 - Darquenne 2012).

#### 2.2.4.2 *La sédimentation gravitationnelle*

La sédimentation gravitationnelle prend en compte l'action prépondérante de la gravité et du frottement par rapport à la vitesse moyenne du gaz. La vitesse de sédimentation terminale des particules  $u_T$  a été définie dans l'équation (2.20). La sédimentation se produit par conséquent dans les petites voies aériennes et les alvéoles dans lesquelles la distance parcourue par les particules est limitée avant d'atteindre les parois. Le dépôt par la sédimentation augmente à la fois avec les tailles de particules et avec le temps de résidence de particules dans les voies aériennes et les alvéoles. Ce mécanisme de dépôt est plus efficace pour les particules dans la gamme de 1 à 8  $\mu\text{m}$ . Une apnée soutenue de 5 – 10 secondes peut maximiser ce mécanisme, en augmentant la pénétration de particules dans les voies aériennes distales (146 - Rubin 2003).

#### 2.2.4.3 *La diffusion Brownienne*

Le dépôt par diffusion Brownienne est caractérisé par le mouvement aléatoire des particules sphériques de liquide dans le gaz. Ce mouvement est similaire à celui de molécules du gaz décrit précédemment, mais les particules diffusent plus lentement en raison de leur taille plus large (135 - Kulkarni 2011). On peut adapter l'expression de la diffusion aux particules en définissant un coefficient de diffusion des particules avec l'équation de Stokes-Einstein (102 - Poling 2001) :

$$D_{12} = \frac{k_B T}{3\pi\mu d_p} \quad (2.31)$$

Ce mécanisme de diffusion des particules dans le gaz est valable à faibles nombres de Reynolds. Il est présent en majorité dans les acini où les vitesses du gaz sont faibles. Le dépôt par la diffusion Brownienne augmente avec la diminution de la taille des particules et devient le mécanisme prédominant pour des tailles inférieures à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre chez l'homme (144 - Darquenne 2012) et 0,1  $\mu\text{m}$  chez le rat (77 - Schulz 2000).

#### 2.2.4.4 *Autres mécanismes*

Le flux turbulent ( $Re > Re_{crit}$ ) résultent en un mélange ce qui influence les dépôts d'aérosol sur les parois. Ce phénomène a lieu pour des vitesses et des tailles caractéristiques élevées par conséquent principalement dans les voies respiratoires de gros calibre. L'interception devient dominante pour certaines formes de particule, comme des fibres allongées par exemple pour lesquelles le contact avec les parois est facilité. Les particules chargées, par ailleurs, peuvent être attirées par les parois par effet

électrostatique.

### 2.2.5 Modèle de rat pour l'évaluation du dépôt d'aérosol

La Figure 2.10 montre la fraction de particules déposée en fonction du diamètre des particules et de la région anatomique chez l'homme et chez le rat. Ces données sont simulées pendant une respiration spontanée nasale d'un volume courant de  $500 \text{ cm}^3$  et un cycle respiratoire de 4 s avec un débit de  $250 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  chez l'homme (147 - Heyder 1986), et un volume courant de  $2 \text{ cm}^3$  et un cycle respiratoire de 0,512 s (fréquence de 117 cycle.min<sup>-1</sup>) chez le rat (148 - Koblinger 1995).

Comme présenté sur la Figure 2.10 (a), les dépôts totaux sont moins efficaces dans la gamme de diamètre de  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$  à  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , pour laquelle les trois mécanismes impaction /sédimentation /diffusion ne sont pas ciblés effectivement. Le dépôt de particules augmente pour les diamètres supérieurs à  $1 \text{ }\mu\text{m}$  par impaction et sédimentation et peut atteindre jusqu'à 100% pour des particules de  $5 \text{ }\mu\text{m}$ . Les dépôts sont également efficaces dans la gamme de diamètres inférieurs à  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$  grâce à la diffusion prédominante, pour atteindre jusqu'à 80% pour des particules de  $0,01 \text{ }\mu\text{m}$  (77 - Schulz 2000). Ces travaux démontrent également que la fraction déposée en fonction de taille de particules chez le rat est comparable à celle de l'homme lors de la respiration spontanée et justifie l'utilisation du modèle rat pour étudier les dépôts.

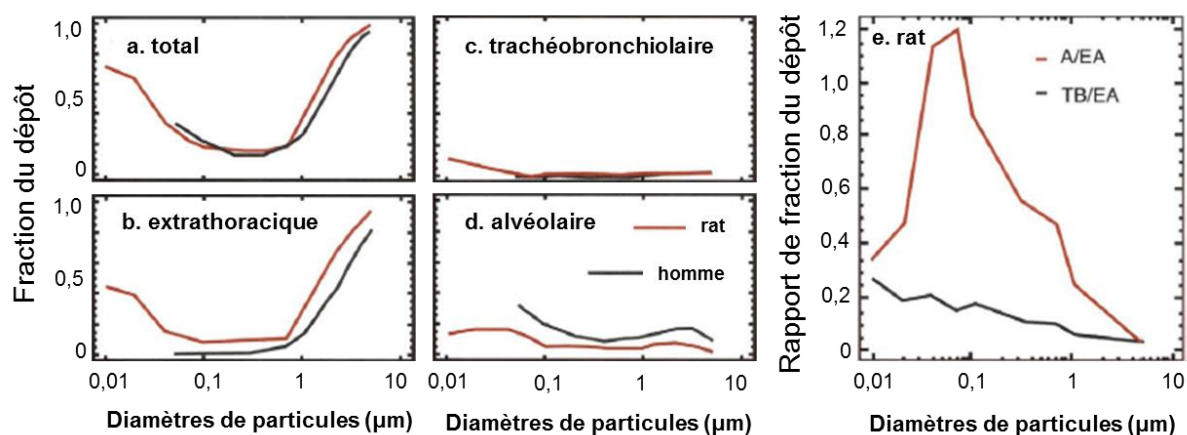


Figure 2.10. (a-d) Résumé des tendances du dépôt de particules total et régional dans les voies aériennes pour les particules sphériques en densité standard (particules sphériques avec diamètre aérodynamique égal au diamètre géométrique). Les valeurs typiques du dépôt chez le rat adulte et chez l'homme pendant la respiration nasale au repos sont illustrées en fonction de diamètres de particules inhalées ( $d_p$ ). Les courbes de fraction du dépôt (normalisée à 1) sont présentées respectivement dans les régions extrathoracique (b), trachéobronchiolaire (c) et alvéolaire (d). Les données chez les rats sont issue de (148 - Koblinger 1995) (série de données Lovelace) et chez l'homme issues de (147 - Heyder 1986). (e) présente l'efficacité des dépôts de particules dans les voies aériennes extrathoraciques chez le rat. Les fractions de particules déposées dans les régions trachéo-bronchiolaire (TB) ou alvéolaire (A) sont comparées à celles déposées dans la région extrathoracique (EA). Les rapports de fractions TB/EA et A/EA sont dérivés de données dans (b-d). Figures extraites de (77 - Schulz 2000).

Dans les différentes régions des voies aériennes chez l'homme et chez le rat (Figure 2.10 (b-d)), les fractions de particules déposées sont similaires dans la région trachéobronchiolaire, mais montrent des différences dans les régions extrathoracique et alvéolaire. Le dépôt extrathoracique a lieu principalement dans le nez et est quasiment comparable par rapport au dépôt total, ce qui démontre un filtrage efficace du nez qui piège la plupart de particules ( $d_p > 0,5 \mu\text{m}$  ou  $d_p < 0,05 \mu\text{m}$ ). La perte de particules dans la région trachéobronchiolaire est relativement faible dans la gamme  $d_p < 0,03 \mu\text{m}$  avec une fraction de dépôt jusqu'à 15%, et extrêmement faible (1% à 3%) pour  $d_p > 0,03 \mu\text{m}$ . Les particules déposées sont plus importantes dans la région alvéolaire par rapport à la région trachéobronchiolaire (Figure 2.10 (e)). La fraction alvéolaire varie entre 15% à 5% dans la gamme  $0,01 \mu\text{m} < d_p < 3 \mu\text{m}$ , et décroît presque à zéro pour  $d_p \sim 5 \mu\text{m}$ .

En résumé, le dépôt trachéobronchiolaire est similaire entre les deux espèces. Le rat possédant un filtrage du nez plus efficace, un dépôt extrathoracique plus élevé et en conséquence un dépôt alvéolaire plus faible peuvent être néanmoins observés chez le rat par rapport à l'homme.

## 2.2.6 Mécanisme de clairance des particules dans les poumons

L'évacuation des particules dans les voies respiratoires par le transport de particules ou par l'absorption dans le sang s'appelle la clairance. Différents mécanismes de clairance se produisent dans chaque région du poumon afin d'éliminer les substances déposées (Figure 2.11 extraite et modifiée de (149 - Zhang 2011)). La clairance des particules dans les poumons de rat a été rapportée comme beaucoup plus rapide que dans les poumons humains (150 - Donovan 1995).

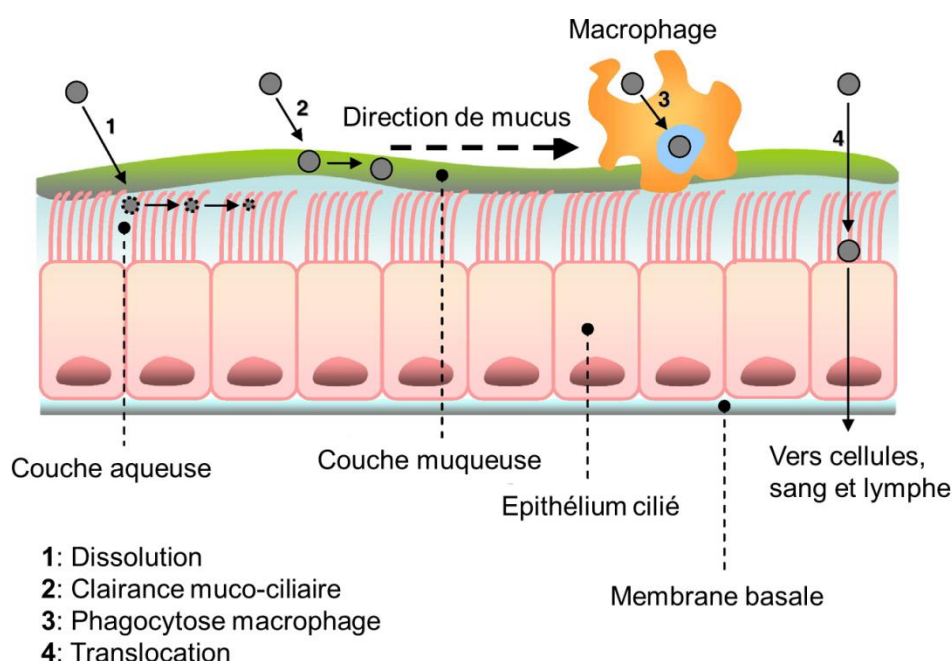


Figure 2.11. Schéma de parois des voies aériennes illustrant les différents mécanismes de clairance de particules inhalés.

#### 2.2.6.1 *Clairance mécanique*

La clairance mécanique se produit principalement dans la région extrathoracique par éternuement, toux ou déglutition. Ce phénomène survient immédiatement après le dépôt de particules lorsqu'ils interviennent dans les voies nasale ou orale. Typiquement, les particules supérieures à 5 µm de diamètre sont déposées par filtrage par les vibrisses du nez (151 - Hussain 2011).

#### 2.2.6.2 *Clairance muco-ciliaire*

La clairance muco-ciliaire est un mécanisme de clairance qui vise à extraire les particules insolubles des voies aériennes ciliées de la région tracheobronchiale. Le mucus chargé de l'aérosol est remonté vers le larynx où il est avalé ou éliminé par crachat. En absence de maladie, la majorité de particules déposées dans la trachée et les bronches sont éliminées en moins de 24 heures. L'efficacité de la clairance muco-ciliaire décroît progressivement des bronches vers les bronchioles.

#### 2.2.6.3 *Clairance par macrophages*

Les macrophages sont des cellules intervenant dans la région alvéolaire qui ont tendance à phagocyter, puis lyser ou déplacer les substances déposés. Lorsque la clairance mécanique ou muco-ciliaire n'est plus possible, les macrophages transportent les dépôts jusqu'au système circulatoire ou lymphatique. Comme il y a un nombre limité de macrophages qui peuvent interagir avec les particules, ce type de clairance est en général lent qui peut, dans certains cas, prendre plusieurs années.

#### 2.2.6.4 *Translocation*

La translocation s'applique aux particules ultrafines (< 0,1 µm) et celles relativement insolubles absorbées par les voies respiratoires et déplacées ensuite jusqu'aux autres compartiments du poumon ou aux autres tissus. Une petite fraction parmi ces particules entre dans le système circulatoire et atteint d'autres organes (152 - Nemmar 2002). Les transferts débutent depuis la région tracheobronchiale *via* la région péribronchique (parois autour des bronches), ou depuis la région alvéolaire *via* l'épithélium alvéolaire. La translocation de nanoparticules est notamment impliquée comme un mécanisme d'administration systémique. Pourtant, ce mécanisme reste mineur par rapport à la clairance par macrophage.

#### 2.2.6.5 *Absorption systémique*

Le mouvement de substances solubles ou de sous-produits de destruction de particules dans la circulation s'appelle l'absorption. L'absorption dans le sang peut avoir deux étapes : (a) la dissolution des particules ; et (b) l'extraction par le sang par diffusion, par exemple. Chaque étape possède une cinétique propre dépendant du type de particules (153 - Bailey 2007). Le taux d'absorption peut être rapide, moyen ou lent (demi-vie d'absorption à l'ordre de quelques minutes jusqu'à quelques heures (154 - Patton 2004, 155 - Olsson 2011)), et peut influencer grandement la toxicité qui est étroitement



liée à la vitesse d'élimination.

Les particules solubles peuvent être lentement absorbées dans le sang, dépendant de leurs propriétés d'absorption et la surface d'échange. Le taux de dissolution de particule est un déterminant majeur qui influence le taux d'absorption dans les voies aériennes. La clairance par absorption survient globalement dans les voies respiratoires avec différents taux dans les différentes régions. Pour caractériser ce type de clairance, on classe les produits en catégorie rapide (15 jour<sup>-1</sup>), moyenne et lente (~1 jour<sup>-1</sup>) en fonction de leurs taux de dissolution spécifique (153 - Bailey 2007).

## 2.2.7 Génération des aérosols

L'invention de générateurs d'aérosol remonte à 1828, avec l'invention d'un atomiseur servant à vaporiser l'eau pour la balnéothérapie et pour l'inhalation. Les recherches sur l'amélioration des médicaments inhalés et des dispositifs associés ont débutés plus tard (en 1929) après la première administration d'adrénaline par voie inhalée (156 - Rau 2005, 157 - Fernández Tena 2012).

Les dispositifs couramment utilisés pour l'administration d'aérosol sont principalement de trois types, respectivement les nébuliseurs, les aérosols-doseurs avec gaz propulseur (Metered Dose Inhalers, MDI) et les inhalateurs de poudre (Dry Powder Inhalers, DPI). Les principes généraux sont rappelés avec des détails donnés pour le nébuliseur à maille vibratoire qui a été utilisé dans ce travail.

### 2.2.7.1 *Nébuliseurs*

Il existe deux types conventionnels de nébuliseurs : nébuliseur pneumatique (dit « à jet ») et nébuliseur ultrasonique.

#### 2.2.7.1.1 Généralités sur les nébuliseurs

Le nébuliseur pneumatique est basé sur le théorème de Bernoulli, qui indique que dans un écoulement fluide, une accélération se produit simultanément avec une diminution de pression. De l'air comprimé, créé par un compresseur, est envoyé à travers un orifice étroit, générant une dépression importante à la sortie. La solution à nébuliser contenue dans un réservoir en sortie est donc aspirée par cette dépression ce qui génère de gouttelettes. Ces gouttelettes sont ensuite sélectionnées : les plus grosses sont arrêtées par impaction sur les parois pour être recyclées sous forme de solution, et les plus petites sont administrées au patient.

Le nébuliseur ultrasonique utilise des cristaux piézoélectriques vibrant à haute fréquence (de l'ordre de quelques MHz) dans un réservoir de nébulisation, ce qui transfère l'énergie vibratoire à la solution à nébuliser avec la création d'une onde stationnaire. Les gouttelettes d'aérosol sont enfin converties par un effet de cavitation de la solution dans le réservoir. Le diamètre moyen des gouttelettes d'aérosol produites par le nébuliseur est proportionnel à la longueur d'onde créée par la fréquence ultrasonore. Cette longueur d'onde  $\lambda$  est inversement proportionnelle à la fréquence ultrasonore  $f_u$ . Le diamètre

d'aérosol généré est caractérisé par :

$$d_p \propto \lambda = \left( \frac{8\pi Y}{\rho f_u^2} \right)^{1/3} \quad (2.32)$$

où  $Y$  est la tension superficielle et  $\rho$  est la densité de solution (158 - Mercer 1973, 138 - O'Callaghan 1997). L'aérosol généré par le nébuliseur ultrasonique est ensuite administré au patient soit par une ventilation continue, ou stocké dans une chambre avant d'être inhalé. Ces systèmes sont silencieux et capables d'aérosoliser rapidement de grandes quantités de médicament. Ils présentent néanmoins une efficacité limitée pour les solutions visqueuses (159 - Newman 1995).

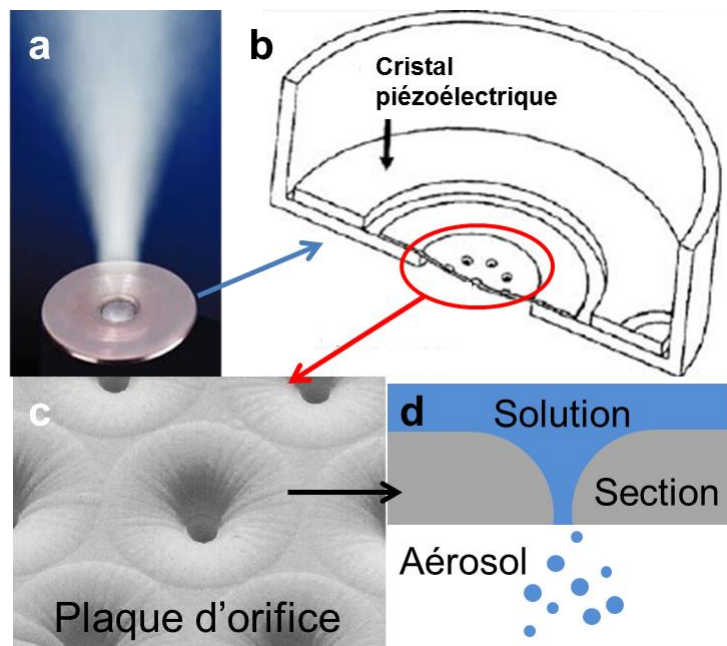


Figure 2.12. Illustration de la structure d'un nébuliseur à maille vibrant. Figure extraite et modifiée de (146 - Rubin 2003). Ce nébuliseur (a) génère l'aérosol avec un cristal piézoélectrique vibrant à haute fréquence (b), faisant vibrer une plaque ayant des orifices étroits (c) et convertissant la solution en gouttelettes d'aérosol (d).

Les nébuliseurs de nouvelle génération et de meilleure efficacité sont actuellement développés, incluant le nébuliseur activé lors de la respiration (nébulisation déclenchée lors de l'inhalation), le nébuliseur rehaussé par la respiration (maximisation du dépôt dans les voies aériennes inférieures), et le nébuliseur rehaussé de taille de particules (production d'une proportion plus importante de particules dans la gamme de taille respirable) (146 - Rubin 2003). Parmi le dernier type de nébuliseurs, un nébuliseur à maille vibratoire a été utilisé dans cette étude. Le système contient une plaque d'orifice de  $\sim$  mm sous forme du dôme incluant plus de 1000 trous en fuseau formé avec précisions, qui sont entourés par un élément vibratoire. Cet élément vibre intensivement la plaque avec un cristal piézoélectrique (plus de 100 kHz), avec une fréquence vibratoire inférieure à celle de nébuliseur ultrasonique. Cette vibration rapide induit chaque orifice à agir comme une pompe microscopique, tirant le liquide à travers les trous pour former les gouttelettes (Figure 2.12). Les nébuliseurs à maille vibrante produisent un aérosol avec un rendement relativement élevé (0,2 – 0,6 mL/min) et un volume

résiduel faible, générant des particules à fine taille et à basse vitesse favorisant son dépôt dans le poumon central et profond (160 - Aerogen). Ils se distinguent des nébuliseurs ultrasoniques par un certain nombre d'avantages, sans chauffer ou dénaturer les solutions et avec une nébulisation efficace de suspension. La taille de particule est déterminée par le diamètre de sortie d'orifice (146 - Rubin 2003).

Les nébuliseurs sont relativement simples d'utilisation et peuvent délivrer des substances thérapeutiques variées avec des doses contrôlables (par exemple via la concentration de la solution ou la durée de nébulisation). Leurs principaux inconvénients sont liés à l'encombrement des compresseurs, qui nécessite une maintenance après usage. Par ailleurs, certains médicaments ne sont pas disponibles sous forme de solution, ce qui empêche l'utilisation de cette technologie.

L'efficacité du dépôt d'aérosol délivré par le nébuliseur dans les poumons du patient est influencée par la perte dans les espaces morts de nébuliseur (tubulures utilisées avant d'arriver à la bouche du patient par exemple) et les rejets à l'expiration (138 - O'Callaghan 1997). La fraction entre la dose déposée effectivement dans les poumons et la dose initialement dans le nébuliseur a été estimée de l'ordre de 10%, comparable parmi les trois types de générateurs d'aérosol (161 - Zainudin 1990). Une apnée peut effectivement augmenter la quantité d'aérosol retenue dans les poumons par un facteur de l'ordre de 14% à 17% (157 - Fernández Tena 2012). Une autre solution pour augmenter l'efficacité du dépôt est de réduire la taille des particules d'aérosol, obtenu par exemple avec une fréquence plus élevée du nébuliseur ultrasonique et par un jet plus rapide pour le nébuliseur pneumatique (157 - Fernández Tena 2012). Le changement du gaz vecteur peut également influencer la taille des particules.

#### 2.2.7.1.2 Facteurs influençant la nébulisation

##### 2.2.7.1.2.1 Viscosité et tension superficielle de la solution

Le volume des particules d'aérosol est proportionnelle à la tension superficielle de la solution à nébuliser, et ce mécanisme a été proposé pour jouer sur le rendement des nébuliseurs (162 - Davis 1978, 163 - Fathi Azarbayjani 2009). Le rendement des nébuliseurs est défini comme la masse par minute de particules dans l'aérosol produit par le nébuliseur. Les solutions possédant une viscosité élevée rendent plus difficile la formation d'un régime permanent d'ondes acoustiques par le cristal vibratoire, et réduisent donc l'efficacité du nébuliseur ultrasonique (138 - O'Callaghan 1997). McCallion *et al.* ont trouvé que la taille des aérosols (donnée en terme de MMAD) était proportionnelle à la viscosité du fluide et qu'une solution plus visqueuse avait un rendement plus bas (164 - McCallion 1995). Il est possible de chauffer la solution à nébuliser pour réduire la viscosité et par conséquent, la taille des particules et la durée de nébulisation (165 - Phipps 1990), enfin éventuellement augmenter le dépôt d'aérosol dans les poumons (166 - Mosbah 2008).

#### **2.2.7.1.2.2 Variabilité entre les nébuliseurs de même type et usure**

Il y a une variabilité importante de l'efficacité entre différents nébuliseurs de même types (167 - Ryan 1981, 168 - Merkus 1992). Par ailleurs, l'utilisation répétitive d'un nébuliseur particulier peut induire de l'usure. Cette usure peut être induite par la dégradation mécanique telle que le nettoyage excessif ou bien par une obstruction de l'orifice par la substance nébulisée (138 - O'Callaghan 1997). L'usure la plus significative correspond à une augmentation du diamètre de l'orifice, ce qui diminue la pression et génère des particules plus grandes (168 - Merkus 1992).

#### **2.2.7.2 Aérosols-doseurs avec gaz propulseur (MDI)**

Les aérosols-doseurs sont des dispositifs utilisés pour administrer des aérosols avec des doses fixes lors d'une inspiration (exemple de la Ventoline pour l'asthme) (130 - Kleinstreuer 2008). Un système de valve doseuse par atomisation, *via* le gaz contenu dans le flacon, est utilisé. La dose de médicament est délivrée dans la bouche de patient avec des vitesses rapides (30 m/s) et le MMAD de particules est compris entre 2 et 4  $\mu\text{m}$  (157 - Fernández Tena 2012). Le système MDI est compact, portable et économique et permet l'administration d'une dose précise. Il est possible d'adapter à un connecteur buccal ou à une chambre d'inhalation, sans besoin de flux d'air élevé ( $> 20 \text{ L/min}$ ). Ces systèmes ont besoin d'une synchronisation de l'inhalation avec le déclenchement ce qui nécessite un apprentissage pour optimiser l'efficacité d'administration. Avec un aérosol-doseur, un dépôt important ( $\sim 80\%$ ) par impaction des particules de grandes tailles est obtenue dans la région oropharyngée (169 - Newman 1981).

#### **2.2.7.3 Inhalateurs de poudre (DPI)**

L'inhalateur de poudre a pour le but d'éviter d'avoir à synchroniser l'inspiration du déclenchement d'un aérosol-doseur. Le médicament sous forme de poudre est contenu dans des gélules (dose unique) ou dans un réservoir (dose multiple). Il est entraîné par le flux d'air inspiratoire. Des débits inspiratoires d'au moins  $30 \text{ L/min}$  sont nécessaires pour désagréger la poudre, et permettre une meilleure dispersion du médicament et un dépôt efficace dans les poumons. Ce débit inspiratoire peut être difficile à obtenir chez les petits enfants et chez les patients souffrant de maladies pulmonaires sévères (157 - Fernández Tena 2012). Pour une administration correcte, le dépôt de dose dans les poumons est comparable avec celui obtenue par aérosol-doseur (170 - Taburet 1994). Les dépôts dans la région pharyngée peuvent être important en raison de l'agglomération de la poudre due à l'humidité induisant des particules plus grosses (171 - Muchao 2010).

#### **2.2.7.4 Synthèse de générateurs d'aérosol**

Nous avons ici résumé les avantages et les limites ainsi que les applications cliniques proposées pour les trois types de générateurs d'aérosol présentés ci-dessus.

Type	Avantage	Limites	Applications appropriées
Nébuliseur	Simplicité d'utilisation	Besoin de préparation du dispositif ; durée de traitement plus long	Dispositif utilisable à tout âge et à toutes les sévérités ou les acuités de maladie
	Dose modifiable	Contamination possible, besoin de maintenance et nettoyage	
	Possibilité de délivrer des substances combinées	Nébuliseur pneumatique moins portable et nébuliseur ultrasonique coûteux	
	Nébuliseur à maille vibratoire petit et portable	Suspension moins bien aérosolisée ; manque de disponibilité de médicaments solubles	
MDI	Taille petite et portabilité ; application rapide	besoin d'application efficace par une synchronisation du déclenchement à l'inhalation	Dispositif préférable pour la thérapie asthmatique et BPCO ; Les enfants $\leq 4$ ans peuvent appliquer des chambres d'inhalation avec masques faciaux
	Sans besoin de préparation de médicament ; durée de traitement courte	Manque de compteur de dose pour la quantité résiduelle	
	Non contamination de substance	Dépôt oropharyngé élevé sans chambre d'inhalation	
	Dose précise ; connectable à l'embout buccal	Limite supérieure de chaque dose ; manque de disponibilité de médicament	
DPI	Types variées (dose unique ou multiple)	Besoin de flux inspiratoire avec débit modéré à élevé	Difficulté d'application chez les petits enfants et patients avec une fonction pulmonaire faible ; recommandation pour les patients $\geq 5$ ans et ceux ayant un flux inspiratoire et volume pulmonaire convenables
	Déclenchement respiratoire plus simple que MDI	Possibilité de dépôt élevé dans la région pharyngée	
	Sans propulseur ; petit, portable et rapide à utiliser	Manque de disponibilité de médicament	
	Durée de traitement courte		
	Sans besoin de chambre d'inhalation ; compteur de dose disponible		

Table 2.3. Résumé des avantages, des limites et des applications des trois types des générateurs d'aérosol couramment utilisés. Extraite de (130 - Kleinstreuer 2008).

## **2.2.8 Modes d'administration des aérosols dans les poumons**

### **2.2.8.1 *Synthèse de modes d'administration***

De multiples modes d'administration dans les poumons ont été proposées, respectivement l'exposition de corps entier, l'inhalation par nez/tête ou l'exposition par poumon (instillation/inhalation intratrachéale) (172 - Phalen 1976). Le choix de la technique d'administration dépend de la disponibilité du dispositif, de la compétence expérimentale de personnel et de la durée d'administration nécessaire. Un résumé des avantages et des limites de différentes voies d'administration est présenté dans la Table 2.4.

Méthode	Application	Avantages	Limites
Exposition corps entier	Etude pharmacologique ; Courte durée / Longue durée, exposition unique et multiple	Voie physiologique ; Sans anesthésie et inconfort pour les animaux ; Réponse complexe (multicellulaire)	Besoin de quantité importante du matériel ; Dose administrée variable
Exposition par nez/tête	Etude pharmacologique ; Courte durée / Longue durée, exposition unique et multiple	Voie relativement physiologique ; Non invasif, sans anesthésie ; Réponse complexe (multicellulaire)	Inconfort léger pour les animaux ; Contrôle inexact de la dose
Instillation intratrachéale	Etude pharmacologique ; Courte durée, administration de dose unique	Dose directement administrée aux poumons ; Réponse complexe (multicellulaire)	Exposition non-physiologique ; Exigence d'anesthésie ; Dosage peu répétitif ; Possibilité de dommages tissulaires ; Manipulation intensive
Instillation oropharyngée	Etude pharmacologique ; Courte durée, administration de dose unique	Dose directement administrée aux poumons ; Non exigence d'intubation ; Réponse complexe (multicellulaire)	Exposition non-physiologique ; Dosage peu répétitif ; Manipulation intensive
Aspiration oropharyngée	Etude pharmacologique ; Courte durée, exposition de dose unique	Dose directement administrée aux poumons ; Non exigence d'intubation ; Réponse complexe (multicellulaire)	Exposition non-physiologique ; Aspiration potentielle de substance orale aux poumons ; Dosage peu répétitif ; Manipulation intensive
Inhalation intratrachéale <sup>a</sup>	Etude pharmacologique ; Courte durée, exposition de dose unique	Dose directement administrée aux poumons ; Réponse complexe (multicellulaire)	Exposition non-physiologique ; Exigence d'anesthésie ; Possibilité de dommages tissulaires ; Manipulation intensive

Table 2.4. Synthèse des avantages et des limites de différentes méthodes d'administration pulmonaire *in vivo*.  
Extraite de (145 - Frohlich 2014). *a* : synthétisé de (173 - Leong 1998, 174 - Lizio 2001).

### 2.2.8.2 ***Inhalation par le nez comparé aux autres modes d'administration***

Comparée aux techniques d'administration intratrachéales couramment utilisées pour l'investigation pulmonaire (l'inhalation et l'instillation intratrachéales), l'inhalation par nez combinée avec une respiration spontanée est la technique la plus appropriée pour les études de dépôts d'aérosol dans les poumons où le profil respiratoire, les propriétés aérodynamiques de l'aérosol et l'homogénéité de distribution des particules sont les intérêts principaux (173 - Leong 1998). Par rapport aux autres voies d'inhalation, tels que l'exposition de corps entier dans une chambre fermée ou l'exposition à l'aide d'un masque facial (couvrant la tête), l'inhalation par nez est plus directe et sa perte de dose est relativement faible parmi ces techniques physiologiques d'inhalation.

La délivrance du nébulisat par le nez de l'animal *in vivo* peut être facilement réalisée *via* un cône adapté à la géométrie du nez. Les propriétés aérodynamiques des particules d'aérosol sont les facteurs fondamentaux influençant le dépôt et la rétention des particules inhalés dans les poumons par inhalation nasale (173 - Leong 1998). Les profils de dépôts obtenus par inhalation spontanée nasale peuvent être plus facilement reliés aux propriétés aérodynamiques et à la ventilation régionale, pour être ensuite comparés avec les résultats *in vitro* et *in silico* (175 - Byron 2010). De plus, la distribution homogène de particules déposés sur une surface plus étendue du tissu pulmonaire permet d'envisager un taux d'absorption plus élevé lors de l'administration de substances solubles (176 - Enna 1972). D'un point de vue de l'imagerie, une administration en respiration spontanée est plus facile à gérer qu'une administration intratrachéale, permettant de réaliser l'imagerie sans avoir à déplacer l'animal.

Quant aux techniques intratrachéale, l'intubation endotrachéale chez le rat est problématique, à cause de géométries étroites de la région oropharyngée et de la trachée du rat (174 - Lizio 2001). Bien que des modèles variables de l'intubation orotrachéale aient été développés, la plupart d'entre eux nécessite des compétences spécifiques et des équipements dédiés, ainsi qu'un savoir-faire important pour réaliser l'intubation sans léser les régions oropharyngée ou endotrachéale. A la place de l'intubation, la trachéotomie est une méthode alternative qui est invasive et ne permet pas les études longitudinales.

L'instillation intratrachéale aboutit généralement à une distribution de dose totale, certe contrôlée, mais considérablement moins uniforme dans les poumons (177 - Brain 1976), en particulier dans la région alvéolaire ce qui peut conduire à des doses localement importantes (178 - Driscoll 2000), beaucoup influencées par la gravité (179 - Klockare 2006). Les doses délivrées aux poumons doivent être en général prudemment contrôlées pour ne pas causer d'effets indésirables. A cause de la nature non-physiologique de la délivrance de particules *via* l'instillation intratrachéale, c'est une technique peu représentative des dépôts physiologiques (178 - Driscoll 2000). La procédure d'instillation intratrachéale exige des compétences techniques particulières et un biais est possible quant à la reproductibilité de l'administration. Enfin, cette procédure peut être invasive et induire des lésions, par exemple de la muqueuse trachéale, ce qui modifie le transport muco-ciliaire (177 - Brain 1976).



Pour un système de nébulisation intratrachéale maintenu pour une certaine durée, l'intubation est nécessaire. Cependant l'insertion et la maintenance d'un cathéter dans la trachée est plus complexe techniquement, et nécessite plus de travail de préparation qu'une insertion temporaire pour l'instillation, ce qui réduit la taille des échantillons (180 - Osier 1997). Néanmoins une technique intratrachéale avec une seringue à jet en dose unique a été développée et appliquée dans les études précliniques (181 - Kardia 2014). Cette manipulation, similaire à celle de l'instillation intratrachéale, pourrait éventuellement augmenter la précision sur la dose et simplifier les manipulations. Pour la délivrance d'aérosol intratrachéale, les cathéters de grand diamètre sont nécessaires afin de réduire la condensation ou le dépôt d'aérosol sur les parois du cathéter (174 - Lizio 2001).

## ***2.3 Etat de l'art des techniques d'imagerie sur les dépôts d'aérosol***

Pour détecter les aérosols déposés dans les poumons *in vivo*, plusieurs techniques d'imagerie peuvent être utilisées. Ces techniques peuvent être basées sur les rayons X (radiographie et tomodensitométrie aux rayons X), et l'imagerie nucléaire comme la scintigraphie, tomographie par émission monophotonique (TEMP) et tomographie par émission de positons (TEP), sur l'IRM ou sur l'optique (imagerie proche infrarouge (NIR) ou de fluorescence) (182 - Roller 2011).

### **2.3.1 Techniques à base de rayons X**

Ces techniques consistent à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus. La tomodensitométrie permet d'acquérir les images tridimensionnelles avec une dose de radiation élevée par rapport à la radiographie conventionnelle. Par ailleurs, le scanner X est plus sensible aux mouvements et nécessite des équipements plus coûteux et complexes (183 - Namati 2006).

Des aérosols à base d'iode peuvent être utilisés sous forme de poudres sèches de nanoparticules. Elles sont détectables sur plusieurs modèles tels que le rat (184 - Aillon 2010, 185 - El-Gendy 2010), ou le lapin (186 - Bayat 2013). L'application de ce type de poudres sèches, combiné avec une procédure d'aérosolisation améliorée, permet de disséminer les agents en concentration élevée dans la périphérie des poumons (184 - Aillon 2010). Alternativement, des nanoparticules d'or ont été utilisées avec potentiellement un meilleur contraste par rapport à l'iode, grâce à son coefficient d'absorption plus élevé (187 - Hainfeld 2006). Des aérosols nanométriques à base d'or ont été générés et inhalés chez les souris pour étudier leur cinétique ainsi que la translocation dans les poumons (188 - Möller 2013). Néanmoins, les limites de ces approches reposent sur la toxicité, telles que les doses élevées utilisées, la stabilité de particules et l'accumulation possible dans des organes secondaires, ce qui limite le transfert chez l'homme.

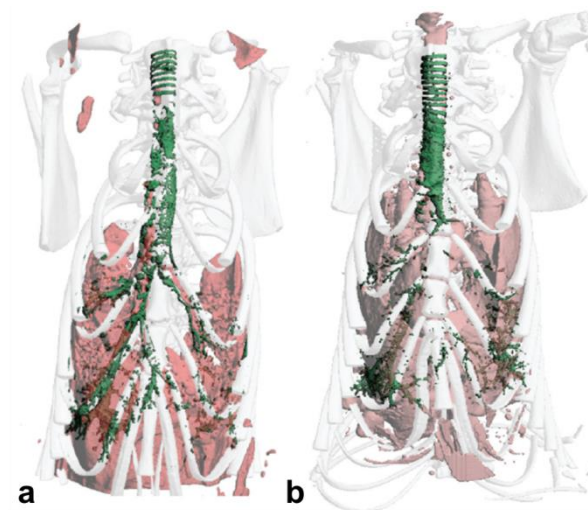


Figure 2.13. Images CT reconstruites en 3D dans les poumons (rose) du rat juste après l'administration de poudres sèches basées sur des nanoparticules (vert) (a) et 2 h plus tard (b). Les dépôts sont observés dans les voies aériennes inférieures après l'administration (a) et dans la trachée et à la périphérie après 2 h d'élimination (b). Issue de (184 - Aillon 2010)

### 2.3.2 Médecine nucléaire

La scintigraphie produit une image fonctionnelle après l'administration d'un produit radiopharmaceutique qui se fixe ou s'accumule sur les organes ou les tissus à explorer. Un produit radioactif émetteur de rayonnements gamma (par exemple le technetium-99m) peut être utilisé avec un détecteur adapté (une gamma-caméra). Il s'agit alors d'une tomographie d'émission monophotonique (TEMP). Si un traceur émet des positons, dont l'annihilation produit deux photons gamma de 511 keV émit en opposition (par exemple le  $^{18}\text{F}$ -FDG), on peut alors utiliser une couronne de détecteurs et on parle alors de tomographie par émission de positons (TEP). Bien qu'elles puissent donner des mesures très sensibles et quantitatives, ces techniques ont des résolutions spatiales relativement faibles et doivent être complétées par d'autres techniques d'imagerie pour avoir accès à l'anatomie (189 - de Kemp 2010). Un cyclotron à proximité doit être disponible pour fabriquer et manipuler les radiopharmaceutiques (190 - Debbage 2008).

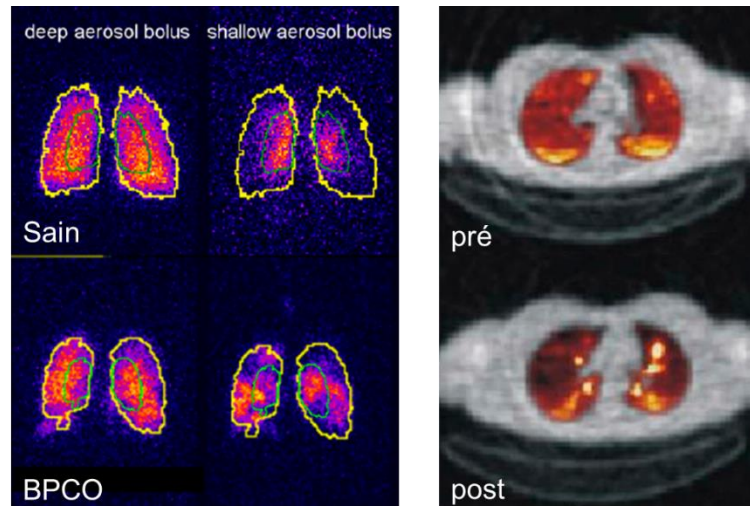


Figure 2.14. (Gauche) TEMP avec du  $^{99m}\text{Tc}$  pendant une inhalation d'aérosol radioactif chez des sujets sain et de BPCO, avec deux conditions d'inhalation (profonde et superficielle). Les régions contournées en jaune indiquent la région totale pulmonaire et les régions contournées en vert indiquent la région centrale. Pendant l'inhalation profonde, les distributions des dépôts sont similaires et relativement homogènes; tandis que pendant l'inhalation superficielle, une distribution plus importante dans la périphérie pulmonaire a été observée chez le sujet BPCO. Issue de (191 - Moller 2008). (Droite) TEP après l'inhalation d'aérosol à base de  $^{18}\text{F}$ -FDG chez un sujet asthmatique pré- et post-challenge pour créer une bronchoconstriction. Avant le challenge, les dépôts sont relativement uniformes. Après le challenge, les dépôts se trouvent plus localisés dans les voies aériennes larges et centrales. Issue de (192 - Dolovich 2009).

L'imagerie TEMP a été utilisée pour étudier la distribution des dépôts et les relier à l'anatomie et à la maladie, après l'inhalation d'aérosols à base de nanoparticules radioactives chez l'homme. L'asymétrie observée avec un dépôt plus élevé dans le poumon gauche par rapport au poumon droit était probablement le résultat de la ventilation pulmonaire asymétrique (193 - Moller 2009). Des dépôts plus élevés ont été observés chez les fumeurs et les patients de BPCO, comparés aux sujets sains (191 - Moller 2008). Dans ces études, la durée d'acquisition est souvent longue pendant laquelle une redistribution et une absorption dans le sang est possible (194 - Huchon 1987), la technique de scintigraphie planaire (195 - Bondesson 2007) ainsi que la TEMP dynamique (1 min/image) (196 - Eberl 2001) peuvent être appliquées pour suivre la clairance pulmonaire. La combinaison de la TEMP et la tomodesitométrie, grâce au développement d'appareils combinés, permet de fournir les informations anatomiques complémentaires pour évaluer les dépôts régionaux (197 - Fleming 2011).

La TEP a permis notamment de déterminer la distribution de dépôt et la clairance dans les poumons (198 - Palko 2010). Elle permet de localiser les dépôts d'aérosols par région, de mesurer l'évolution de la prise et de l'élimination de marqueur, ainsi que de corrélérer les variations de dépôt à la maladie pulmonaire (192 - Dolovich 2009). Toutefois, la gamme de radioéléments disponibles est limitée et les conditions d'imagerie doivent s'adapter à la demi-vie des éléments utilisés, ce qui complique l'application de cette méthode (199 - Saha 1992).

### 2.3.3 Techniques optiques

Les photons dans la gamme de l'optique peuvent être mis à profit. Par exemple, l'imagerie de fluorescence a de bonnes résolutions temporelle et spatiale. Cependant la dispersion, la réflexion et l'absorption de ce rayonnement lumineux par les tissus complique l'analyse et l'interprétation (200 - Nahar 2013). En général, une sonde locale est nécessaire, ce qui donne un aspect invasif et limite le champ de vue. Pour des petits animaux, il est néanmoins possible de réaliser de l'imagerie corps entier. Un exemple est donné pour illustration sur la figure suivante. Peu d'étude d'imagerie des dépôts *in vivo* ont été réalisés avec cette approche. C'est en revanche une approche de choix pour des études *in vitro* et *post-mortem*.

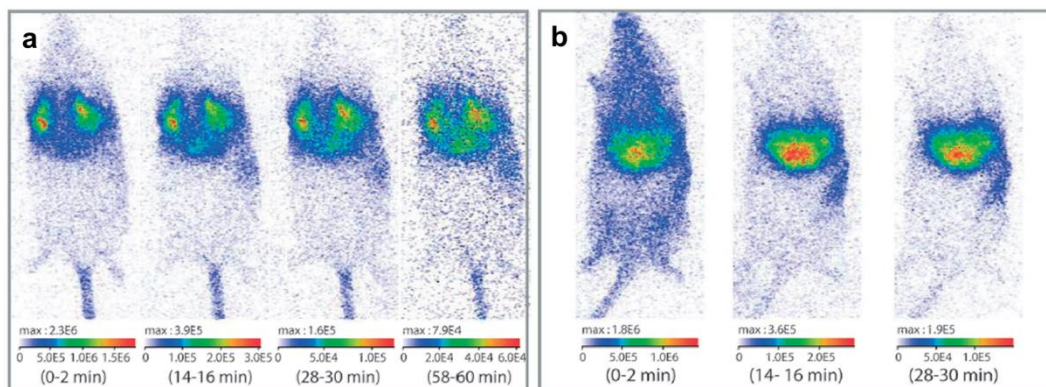


Figure 2.15. Imagerie proche infrarouge chez la souris après injection de nanoparticules luminescentes au cours du temps. Les particules chargées positivement (a) sont capturées dans la microcirculation dans le poumon ; tandis que les particules chargées négativement (b) s'accumulent dans le foie et non dans le poumon. Issue de (201 - le Masne de Chermont 2007).

Après sacrifice de l'animal, une concentration lobaire uniforme a été observée sur la souris à la suite de l'administration d'un aérosol fluorescent (202 - Yi 2010). Les molécules fluorescentes marquées peuvent ainsi potentiellement être administrées sous forme de l'aérosol, et imagées *in vivo* par imagerie du proche infrarouge, ce qui limite l'atténuation tissulaire (203 - Adams 2007, 204 - Zintchenko 2009). La fonctionnalisation des particules pourrait de plus servir à cibler spécifiquement le poumon (201 - le Masne de Chermont 2007).

### 2.3.4 IRM

En ce qui concerne l'IRM du proton, l'administration intrapulmonaire d'agent de contraste IRM, combinée avec des séquences d'imagerie spécifiques (205 - Montgomery 1987, 206 - Berthezene 1992) ouvre une nouvelle possibilité pour l'imagerie des aérosols dans les poumons avec une technique d'imagerie non-ionisante. Les aérosols à base de manganèse offrent une solution intéressante en raison de leur diamètre hydrodynamique petit et leur solubilité élevée (207 - Gobbo 2012). Néanmoins leur toxicité reste importante suggérant un transfert limité chez l'homme. Les agents de contraste standards, tels que les particules paramagnétiques basés sur des chélates de Gadolinium (208 - Haage 2001, 209 - Suga 2002, 210 - Suga 2003, 211 - Hirsch 2004, 212 - Sood 2008) et les nanoparticules

superparamagnétiques à base d'oxydes de fer (213 - Martin 2008, 214 - Sarracanie 2012, 215 - Oakes 2013) ont été administrés avec succès sous forme d'aérosol chez des modèles animaux. Les séquences conventionnelles, telles que l'écho de spin (208 - Haage 2001, 213 - Martin 2008, 212 - Sood 2008) ou l'écho de gradients (209 - Suga 2002, 210 - Suga 2003, 214 - Sarracanie 2012, 215 - Oakes 2013) ont été appliquées pour détecter le rehaussement de contraste généré par les dépôts d'agents de contraste aérosolisés. Plus récemment, les séquences à temps d'écho ultra-court (UTE), plus adaptées à l'imagerie du parenchyme pulmonaire ont été implémentées pour réduire les artéfacts de mouvement respiratoires et limiter les effets de  $T_2^*$  court dans les poumons. Les acquisitions UTE radiales ont été utilisées pour imager l'inflammation bactérienne pulmonaire après une injection intraveineuse de particules d'oxyde de fer (216 - Strobel 2012), ainsi que pour évaluer la biodistribution et la pharmacocinétique de nanoparticules basées sur du gadolinium après instillation intratrachéale chez les souris (217 - Bianchi 2013).

### 2.3.5 Résumé

	CT	TEMP	TEP	IRM	NIR	Fluorescence
Résolution spatiale ( $\mu\text{m}$ )	50-200	500-1700	1000-2000	100-2000	1-5000	0,001-3
Résolution temporelle (ms)	150-300	25-100	300-60,000	15-5000	10-1000	0,001-1000
Sensibilité	+	+++	+++	++	++	+++
Profondeur d'observation	+++	+++	+++	+++	++	+
Radiation (cGy)	10-20	10-100	10-100	-	-	-
Envahissement	++	++	++	+	+	+++
Coût, équipement	++	+++	+++	+++	+	+

Table 2.5. Comparaison des techniques d'imagerie pour la visualisation de dépôt de particules *in vivo* dans les poumons. Marques décrivant le niveau : +++ élevé, ++ intermédiaire, + faible, - aucun. Issue de (218 - Roller).

Parmi ces techniques permettant de détecter les dépôts d'aérosol, l'IRM est une approche non-ionisante et non-invasive ayant un champ de vue large, des résolutions spatiales et temporelles performantes et une bonne sensibilité au rehaussement de signal à la suite de dépôts d'agent de contraste.

Le développement d'aérosol à base d'agents de contraste multimodaux est une perspective pour améliorer la détection des dépôts par la combinaison des avantages des différentes techniques d'imagerie, fournissant des informations complémentaires anatomiques et fonctionnelles. Il y a effectivement des nombreuses études menées sur ce sujet (219 - Le Trequesser 2013), telles que IRM/fluorescence (220 - Bianchi 2014) et IRM/CT (221 - Beija 2012) par exemple. Le développement de nanoparticules ciblant les cellules pulmonaires, qui soient à la fois diagnostiques et thérapeutiques, est proposé (222 - Bur 2009).



## Chapitre 3.

# Matériel et méthode pour la quantification des dépôts d'aérosol par IRM

---

L'évaluation des dépôts d'aérosol nécessite la mise en place de méthodes de quantification précises et de matériel expérimental dédié. Nous présenterons dans un premier temps les méthodes de quantification des agents de contraste par IRM et comparons la sensibilité de détection. Par la suite, la taille de différents aérosols pouvant servir d'agent de contraste par IRM et générés avec un nébuliseur sont caractérisés à l'aide de deux méthodes conventionnelles. Il s'agit de chélates de Gadolinium et de perfluorocarbones liquides. La mise en place des équipements et des séquences pour l'imagerie *in vivo* du rat à 1,5 T sera enfin présentée. En particulier, la réalisation d'une antenne double-résonance fluor/proton et ses performances *in vitro* et *in vivo* seront montrés.

---

### 3.1 Méthode de quantification d'agents de contraste

Dans cette partie, nous nous intéressons aux méthodes de quantification des agents de contraste par IRM. Comme introduit dans le chapitre 1.3, les différents type de contraste, tels que  $T_1$ ,  $T_2^*$  ou phase, peuvent être quantifiés. Dans un premier temps, une étude *in vitro* et *in silico* (par simulation) sur la sensibilité de détection basée sur  $T_2^*$  et phase a été mise au point. La précision de la mesure de la concentration de l'agent de contraste mesurée et simulée avec les méthodes de cartographie de  $R_2^*$  et de phase seront comparée et leurs limites de détection respectives seront discutées. Ensuite, les approches quantitatives plus directement applicable *in vivo* sur les rats, basée sur  $T_1$  et  $T_2^*$ , seront introduites.

#### 3.1.1 Limite de détection d'agents de contraste via l'amplitude et la phase

##### 3.1.1.1 Introduction

D'une manière générale, l'augmentation de la sensibilité de détection est un aspect important des développements méthodologiques en IRM. Une approche populaire est basée sur l'utilisation d'agents de contraste pour des applications variées en cardiologie, neurologie ou cancérologie. Plus récemment, l'imagerie moléculaire par IRM a eu un regain d'intérêt avec la détection et la quantification d'agents de contraste ciblant certains types cellulaires spécifiques introduisant de nouvelles méthodes pour détecter des marqueurs du cancer ou de maladies neurodégénératives (223 - Kircher 2012, 224 - Kircher 2012). Pour l'imagerie moléculaire, la gamme des concentrations de marqueurs (nano à picomolaire) est critique (225 - Massoud 2003). Les types d'agent de contraste les plus courants sont

basés sur des matériaux paramagnétiques, par exemple avec les chélates de Gadolinium, et superparamagnétiques, par exemple avec les nanoparticules d'oxyde de fer (IONP). Le mécanisme de contraste exploité dépend souvent de l'augmentation de taux de relaxation des protons de l'eau. Le taux de relaxation transversale apparente  $R_2^*$  et la susceptibilité magnétique  $\chi$  (11 - Haacke 1999,31 - de Rochefort 2008) sont des paramètres distincts mesurables, qui peuvent être utilisés pour quantifier l'agent de contraste à partir des mêmes jeux de données d'écho de gradient. La cartographie de  $R_2^*$  a besoin de temps d'écho multiples et se base sur l'analyse de décroissance de l'amplitude du signal. Elle caractérise la dispersion de fréquence intra-voxel. Récemment, la cartographie de susceptibilité quantitative (QSM, Quantitative Susceptibility Mapping) a été introduite avec des applications potentielles pour la quantification des agents de contraste (226 - Shmueli 2009,26 - de Rochefort 2010). QSM est basée sur la cartographie du champ magnétique qui peut être extrait des données de phase de la même acquisition en écho de gradient que la cartographie  $R_2^*$ . La cartographie de champ caractérise le décalage moyen intra-voxel de la fréquence de résonance au lieu de sa dispersion. Puisque basés sur les mêmes acquisitions, l'un ( $R_2^*$ ) utilisant l'amplitude, l'autre ( $\chi$ ) la phase, nous avons cherché à comparer théoriquement et expérimentalement les performances de ces approches de quantification sur un système clinique, estimant également la limite de détection de ces approches.

### 3.1.1.2 Contexte théorique

Dans une séquence en écho de gradient multi-écho, l'amplitude et la phase du signal peuvent être utilisés pour quantifier la concentration de l'agent de contraste. Les principes de base sont revus pour introduire leurs précisions respectives.

#### 3.1.1.2.1 Concentration basée sur l'amplitude

Des cartes paramétriques de  $R_2^*$  peuvent être calculées en ajustant la décroissance du signal à une exponentielle pour plusieurs TE :

$$|S| = |S_0| \exp(-R_2^* \cdot TE) \quad (3.1)$$

Pour des concentrations usuelles (de l'ordre du mM),  $R_2^*$  est supposé augmenter linéairement avec la concentration de l'agent de contraste :

$$R_2^* = R_{2,0}^* + r_2^* \cdot C \quad (3.2)$$

avec  $R_{2,0}^*$  le taux de relaxation intrinsèque au sein de tissu ou milieu d'intérêt,  $C$  la concentration de l'agent de contraste locale, et  $r_2^*$  la relaxivité molaire transversale de l'agent de contraste. La relaxivité  $r_2^*$  inclut les deux effets de la relaxivité transversale  $r_2$  et de dispersion intra-voxel, cette dernière pouvant dépendre de la distribution spatiale de l'agent dans le voxel (compartimentalisation possible) (227 - Weisskoff 1994,11 - Haacke 1999). Une géométrie dans laquelle ces derniers effets peuvent être négligés est le cylindre infini aligné à  $B_0$  qui fournit des décalages de champ homogènes (228 - Chu 1990,11 - Haacke 1999). Après calibration de la relaxivité molaire, la concentration  $C$  peut être estimée à partir du taux de relaxation transversale. Il est ensuite possible d'évaluer la précision sur la



concentration dérivée de la décroissance du module du signal  $\sigma_{C,m}$ ,

$$\sigma_{C,m} = \frac{\sigma_{R_2^*}}{r_2^*} \quad (3.3)$$

proportionnelle à la précision de  $R_2^*$ , caractérisée par son écart-type  $\sigma_{R_2^*}$  qui sera déterminé plus loin.

### 3.1.1.2.2 Concentration basée sur la phase

A partir de la phase du signal, des cartes de fréquence peut être calculées en supposant une augmentation linéaire de phase en fonction de TE :

$$-\arg(S) = \varphi = \varphi_0 + 2\pi fTE \quad (3.4)$$

Pour les agents de contraste paramagnétiques and superparamagnétiques présents dans un milieu possédant une susceptibilité  $\chi_0$  (généralement diamagnétique proche de la susceptibilité de l'eau de - 9 ppm), la susceptibilité magnétique volumique totale dépend linéairement de concentration (31 - de Rochefort 2008):

$$\chi = \chi_0 + \chi_M \cdot C \quad (3.5)$$

où  $\chi_M$  est la susceptibilité molaire de l'agent de contraste.

Il a été reconnu à la suite des approches QSM que la carte de fréquence dépend de la distribution de susceptibilité magnétique d'une manière complexe *via* des facteurs de forme (229 - Marques 2005,230 - Hoffman 2006,31 - de Rochefort 2008). A supposer que la forme du contenant soit connue, la carte de fréquence peut être décomposée en des effets provenant de l'agent de contraste et des effets de sources externes  $f_0$  :

$$f = f_0 + \frac{\gamma B_0}{2\pi} F \chi \quad (3.6)$$

où  $\frac{\gamma B_0}{2\pi}$  correspond à la fréquence de Larmor. Les effets externes peuvent provenir des shims, mais également des interfaces air-tissu qui dominent les variations de susceptibilités en pratique. Ces effets peuvent être plus importants pour des formes complexes et requièrent des méthodes de filtrage spatial efficaces telles que le filtrage harmonique (27 - de Rochefort 2008,231 - Schweser 2011). Une géométrie simplifiée dans laquelle ces effets sont limités est le cylindre infini aligné avec le champ principal  $B_0$  pour lequel le facteur de forme est spatialement constant et égale à  $F = 1/3$  (228 - Chu 1990,11 - Haacke 1999,229 - Marques 2005). Il est donc possible d'estimer la précision sur la mesure de la concentration dérivée de la phase  $\sigma_{C,p}$  :

$$\sigma_{C,p} = \frac{\sigma_f}{\frac{\gamma B_0}{2\pi} \cdot F \cdot \chi_M} \quad (3.7)$$

proportionnelle à la précision sur la détermination de la fréquence, caractérisée par son écart-type  $\sigma_f$  qui sera déterminé plus loin.

### 3.1.1.3 Matériels et méthodes

#### 3.1.1.3.1 Préparation de fantôme

Des fantômes avec deux types d'agents de contraste ont été réalisés, gadoterate meglumine (Gd-DOTA) [Dotarem®; Guerbet, Villepinte, France] et nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (IONP) [Endorem®; Guerbet, Villepinte, France], agents de contraste particulièrement utilisés pour leurs effets de relaxation transversale apparente. Des tubes cylindriques de 12 cm de longueur, de 13 mm de diamètre ont été remplis de solutions avec des concentrations variables d'agent de contraste. Ils ont ensuite été immergés dans un récipient cylindrique rempli d'eau (30 cm de longueur, 12 cm de diamètre). Les concentrations de Gd-DOTA variaient de 2,5 mM à 20 mM par pas de 2,5 mM et les concentrations IONP variaient de 25  $\mu$ M à 200  $\mu$ M par pas de 25  $\mu$ M de fer.

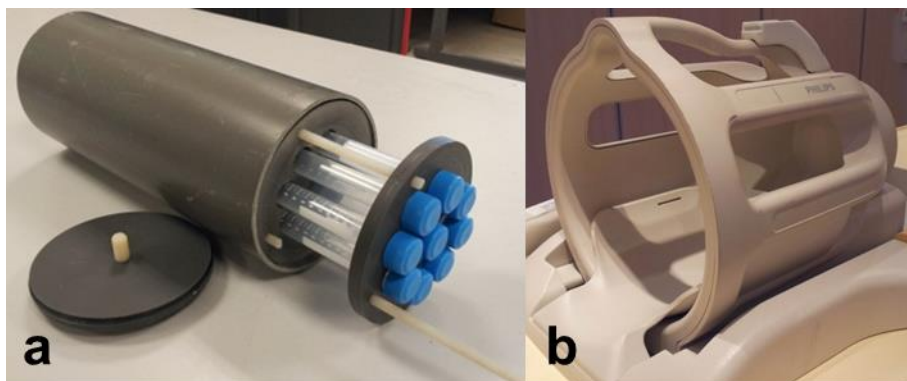


Figure 3.1. (a) Photo du récipient cylindrique fabriqué au sein du laboratoire et les échantillons placés à l'intérieur. (b) Photo de l'antenne tête avec 8 canaux.

#### 3.1.1.3.2 Paramètres IRM

Les expériences ont été réalisées à 1,5 T [Achieva, Philips, Best, The Netherlands]. Le récipient et les tubes étaient placés alignés au champ magnétique principal dans une antenne tête avec 8 canaux. Le shimming volumique automatique a été effectué, puis une séquence en écho de gradient multi-échos avec les paramètres suivants a été appliquée :  $TR / TE_1 / \Delta TE = 641 \text{ ms} / 1,79 \text{ ms} / 2,45 \text{ ms}$ ,  $15^\circ$  d'angle de basculement, 32 échos, champ de vue (FOV) = 192 mm, 1,5 mm de résolution dans le plan, 5 mm d'épaisseur de coupes axiales et 1,3 kHz de bande passante par pixel. Ces paramètres permettaient d'obtenir un contraste en densité de proton pour le premier écho afin que le traitement et l'analyse par la suite ne soit pas biaisé par des effets de relaxation longitudinale.

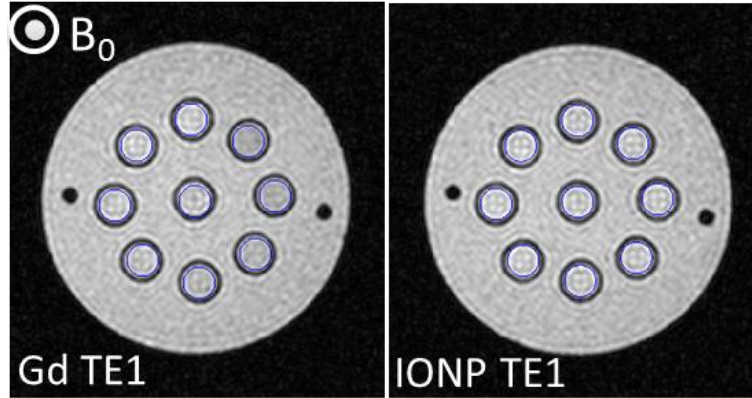


Figure 3.2. Les images obtenues en amplitude présentant un contraste de densité de proton pour le premier écho ( $TE_1$ ). Les intensités de signal étaient quasiment identiques pour les différentes concentrations des agents de contraste. Nous supposons donc que le traitement et l'analyse par la suite ne sera pas biaisé par des effets de relaxation longitudinale. Le sens du champ magnétique statique  $B_0$  est indiqué.

### 3.1.1.3.3 Reconstruction de carte de $R_2^*$ et de fréquence

Tous les données ont été traitées hors ligne avec Matlab [2012a version; The Mathworks, Natick, MA]. Les images Dicom ont été utilisées. Celles-ci étaient reconstruites avec un facteur d'interpolation (zerofill) de 2. La coupe la plus centrale par rapport aux tubes a été analysée.

Concernant la séquence multi-échos ( $n > 2$ ), il s'agit ensuite d'un ajustement à un modèle mono-exponentiel pour une évaluation optimale de  $R_2^*$ . En effet, la précision de  $R_2^*$  mesuré peut être considérablement réduite avec un RSB faible, comme le bruit domine sur l'image à TE long. Pour cela, les différentes méthodes d'ajustement ont été proposées, soit par un ajustement conventionnel telle que la méthode des moindres carrés (232 - Björck 1996), soit un ajustement par une fonction exponentielle avec correction de bruit proposé par (233 - Raya 2010). Les algorithmes variables peuvent servir à optimiser l'ajustement en résolvant le problème de minimisation, tels que la méthode de Nelder-Mead (234 - Lagarias 1998) et l'algorithme de Levenberg-Marquardt (235 - Gill 1978).

La carte de  $R_2^*$  a été reconstruite par un ajustement non-linéaire au sens des moindres carrés à une décroissance mono-exponentielle optimisé par la méthode de Nelder-Mead, exprimé par une minimisation de l'erreur :

$$\| S - S_{fit} \|_2^2 \quad (3.8)$$

où  $S$  et  $S_{fit}$  présentent respectivement le signal mesuré et ajusté sous la forme présentée dans l'équation (3.1). Cette procédure simple d'ajustement a été comparée à la méthode proposée par Raya *et al.* (233 - Raya 2010) par une fonction exponentielle avec correction de bruit (méthode par la suite notée NCEXP, pour Noise-Corrected EXponential, qui corrige du biais « ricien » résultant de la considération de l'amplitude du signal). L'étude de Raya a montré que NCEXP fournit un ajustement exact et une précision comparable aux précisions théoriquement atteignable données par la borne inférieure de Cramér-Rao (CRLB, Cramer-Rao Lower Bound). En considérant le RSB assez élevé

dans l'expérience, nous avons vérifié qu'un ajustement mono-exponentiel marchait aussi bien et donnait les mêmes exactitude et précision permettant d'obtenir le CRLB théorique. Cet ajustement mono-exponentiel a été utilisé par la suite pour sa simplicité. En terme de propagation de bruit, l'inverse de la matrice d'information de Fisher (notée  $\mathcal{F}^{-1}$ ) est la matrice de covariance du bruit et s'approxime assez simplement pour des RSB élevés permettant de considérer le bruit comme Gaussien (233 - Raya 2010). La composante diagonale de la matrice de covariance du bruit estime la précision sur le paramètre  $R_2^*$  :

$$\sigma_{R_2^*}^2 = (\mathcal{F}^{-1})_{22} = \frac{\sigma^2}{S^2} \frac{A_{11}}{A_{11} \cdot A_{22} - A_{12}^2} \quad (3.9)$$

où  $A_{ii}$  sont des éléments de la matrice  $\mathcal{F}$ , défini comme  $A_{11} = \frac{1}{2R_2^*} [1 - E_{max}]$ ,  $A_{12} = A_{21} = \frac{1}{2R_2^*} [-T \cdot E_{max} + A_{11}]$ , et  $A_{22} = \frac{1}{2R_2^*} [-T^2 \cdot E_{max} + 2A_{12}]$ , avec  $E_{max} = \exp(-2R_2^*(TE_{max} - TE_{min}))$  et  $T = TE_{max}$ .

Pour reconstruire les cartes de fréquence, les cartes de phase étaient d'abord dépliées dans le temps. Pour cela, une transformée de Fourier des signaux complexes mesurés a été effectuée dans la direction temporelle (32 échos). Un facteur d'interpolation (zero-filling) de 512 a été utilisé (discretisant le cercle unité pour mieux déterminer la fréquence). Pour chaque voxel, la location du maximum du spectre permettait d'estimer la fréquence qui rephasait au mieux les échos. Cette estimation était ensuite utilisée pour déplier les cartes de phase en fonction de l'écho. La phase dépliée étant une fonction affine de la fréquence, un ajustement linéaire au sens des moindres carrées, pondérés par le RSB de chaque écho, permettait d'estimer la fréquence (26 - de Rochefort 2010). Pour une intensité de signal suffisamment élevée par rapport au bruit ( $|S| > 2\sigma$ , où  $\sigma$  dénote l'écart-type du bruit, soit  $RSB > 2$ ), la précision de la cartographie de phase est proportionnelle à  $|S|/\sigma$  (25 - Conturo 1990). Le principe est donc d'ajouter une pondération plus faible quand  $|S|/\sigma$  devient plus faible avec des TE plus long. La minimisation au sens des moindres carrées linéaire est exprimée formellement par :

$$\min_{\varphi_0, f} \| |S|(\varphi_0 + 2\pi f TE - \varphi_{meas}(TE)) \|_2^2 \quad (3.10)$$

où  $\varphi_{meas}$  représente les phases mesurées. Dans ce processus, les phases qui correspondent à un TE plus long et fournissent plus d'information sur la fréquence  $f$  peuvent également être pondérées quand leurs signaux associés deviennent faibles en raison de la relaxation transversale. Ce problème linéaire est très simple à résoudre et la précision sur les paramètres ajustés, qui du coup dépendent de la relaxation transversale, se déduisent de la matrice de covariance du bruit de ce problème linéaire. Il se trouve que cette dernière est exactement la même que pour l'ajustement d'une exponentielle décroissante *via* l'amplitude. En d'autres termes il est théoriquement aussi précis d'ajuster une exponentielle « réelle » caractérisant la relaxation qu'une exponentielle complexe caractérisant un déphasage simultané. Nous allons vérifier ces aspects expérimentalement.

#### 3.1.1.3.4 Estimation de la précision sur les relaxivité et susceptibilité molaires

Des régions d'intérêt (ROI) circulaires étaient tracées sur les tubes, incluant ~160 voxels. La moyenne

et l'écart-type de  $R_2^*$  et du décalage de fréquence ont été calculés et liés à la concentration de l'agent de contraste. Des ajustements au sens des moindres carrées ont été effectués pour déterminer la relaxivité molaire  $r_2^*$  (équation (3.2)) et le produit  $\frac{\gamma B_0}{2\pi} F\chi$  (équation (3.5) et (3.6)). Les écart-types ont ensuite été convertis en une erreur de concentration comme décrit précédemment (équation (3.3) et (3.7)) pour être enfin comparés entre les dérivations *via* l'amplitude et *via* la phase. Pour comparer à la valeur théorique, la susceptibilité magnétique molaire  $\chi_M$  a été déterminée en supposant un facteur de forme de  $F = 1/3$ , obtenue avec une géométrie idéalisée d'un cylindre infini aligné avec le champ  $B_0$ .

### 3.1.1.3.5 Simulation numérique

Afin de comparer les écart-types mesurés à la théorie, les algorithmes d'ajustement de  $R_2^*$  et de fréquence ont été appliqués à une décroissance exponentielle simulée contenant les effets de relaxation et de décalage de fréquence. La décroissance simulée contenait également un bruit complexe, soit le bruit Gaussien pour les parties réelles et imaginaires avec la même variance, de telle manière que le rapport signal sur bruit (RSB) était égale à 25 pour le premier écho, valeur obtenue dans les expériences. La procédure était répétée 1024 fois avec une génération de bruit aléatoire différente. Toute la gamme expérimentale de  $T_2^*$  a été simulée. Les écart-types simulés ont été obtenus à la fois pour la relaxivité et pour la fréquence. De plus, comme la meilleure précision atteignable pour  $R_2^*$  peut être calculée analytiquement par le CRLB théorique si la distribution du bruit est connue (233 - Raya 2010), nous avons vérifié que la précision simulée correspondait à la précision théorique, démontrant ainsi que la solution choisie pour réaliser l'ajustement permettait d'atteindre la capacité intrinsèque de quantification.

### 3.1.1.4 Résultats

#### 3.1.1.4.1 Expériences sur fantôme

Une dépendance linéaire avec la concentration a été obtenue à la fois pour  $R_2^*$  et pour la fréquence pour le Gd-DOTA and les IONP (Figure 3.3 et Figure 3.4). Une relaxivité molaire  $r_2^* = 5,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  et une susceptibilité molaire  $\chi_M = 363 \text{ ppm.M}^{-1}$  (équivalente à un effet molaire de fréquence de  $7,7 \text{ Hz.mM}^{-1}$ ) ont été mesurées pour Gd-DOTA (Figure 3.3c). Les pentes étaient comparables avec amplitude légèrement plus faible (dispersion de fréquence) que des effets de phase (décalage de fréquence). Une relaxivité molaire  $r_2^* = 202,3 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  et une susceptibilité molaire  $\chi_M = 3216 \text{ ppm.M}^{-1}$  (équivalente à un effet molaire de fréquence de  $68,4 \text{ Hz.mM}^{-1}$ ) ont été mesurés pour les IONP (Figure 3.4c). Les effets d'amplitude étaient plus élevés que les effets de phase pour les IONP.

Une fois convertie en termes d'erreur sur la concentration en utilisant ces pentes de calibration, les écart-types augmentaient avec la concentration pour les deux méthodes de quantification basées sur l'amplitude et sur la phase (Figure 3.3d et Figure 3.4d). Qualitativement sur les cartes de concentration dérivée par l'amplitude le bruit est plus important que sur les cartes de concentration dérivée de la phase.

La précision par la méthode basée sur l'amplitude variait de 0,1 à 1,4 mM pour Gd-DOTA, et de 2,7 à 15  $\mu$ M pour les IONP, la précision basée sur la phase variait de 0,02 à 0,5 mM pour Gd, et de 1,5 à 7  $\mu$ M pour IONP. Quel que soit l'agent de contraste utilisé, la mesure de concentration basée sur la phase était entre 2,4 et 6 fois plus précise pour le Gd-DOTA, et entre 1,5 et 4,2 fois pour les IONP. A partir de ces jeux de données, la limite de précision pour ce système et ces paramètres d'acquisition a été évalués à 18  $\mu$ M et 1,5  $\mu$ M pour la concentration dérivée de la phase respectivement le Gd-DOTA et les IONP.

### 3.1.1.4.2 Simulation numérique

L'écart-type mesuré et théorique correspondaient bien pour l'expérience avec Gd-DOTA (Figure 3.3d), cependant l'écart-type mesuré pour les IONP n'étaient pas complètement expliqué par la théorie (Figure 3.4d), bien que la tendance d'une mesure de concentration plus précise *via* le décalage de fréquence a été également observée.

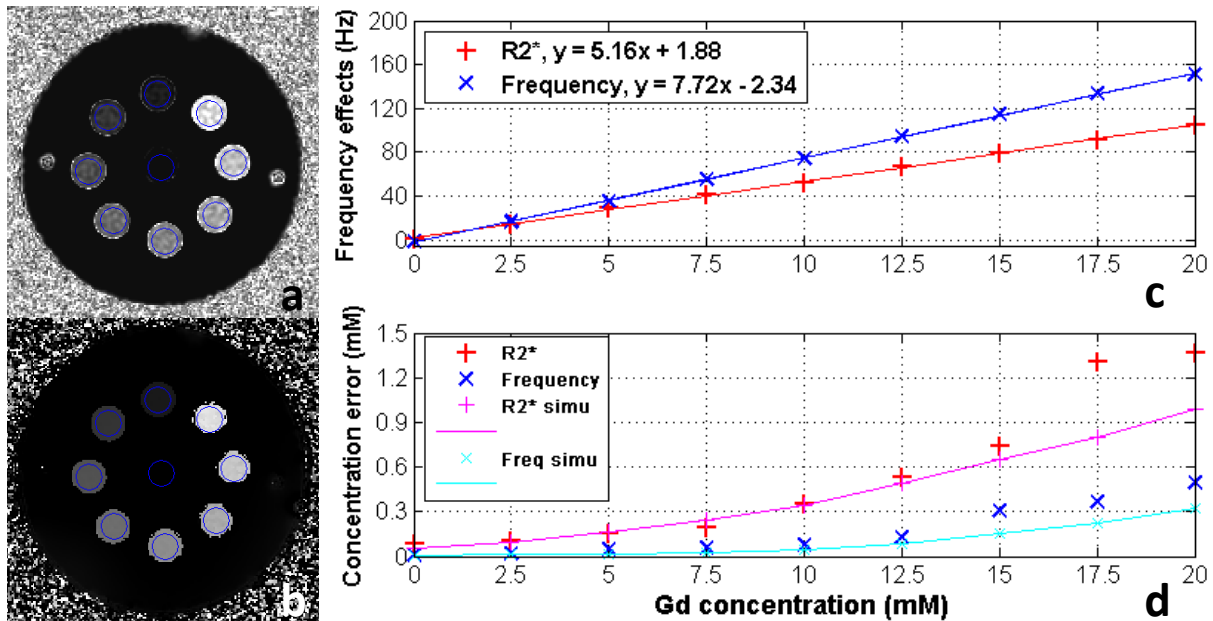


Figure 3.3. Cartes de concentration dérivée de l'amplitude (a) et de la phase (b) pour Gd-DOTA. Le  $R_2^*$  et le décalage de fréquence mesurés (c) augmentent linéairement avec la concentration. Leur écart-type de concentration associé (d: points) montre aussi une dépendance sur la concentration. La quantification basée sur la phase montre une erreur plus faible. L'écart-type sur la concentration par la simulation (d: lignes pleine) correspondait entre théorie et expérience.

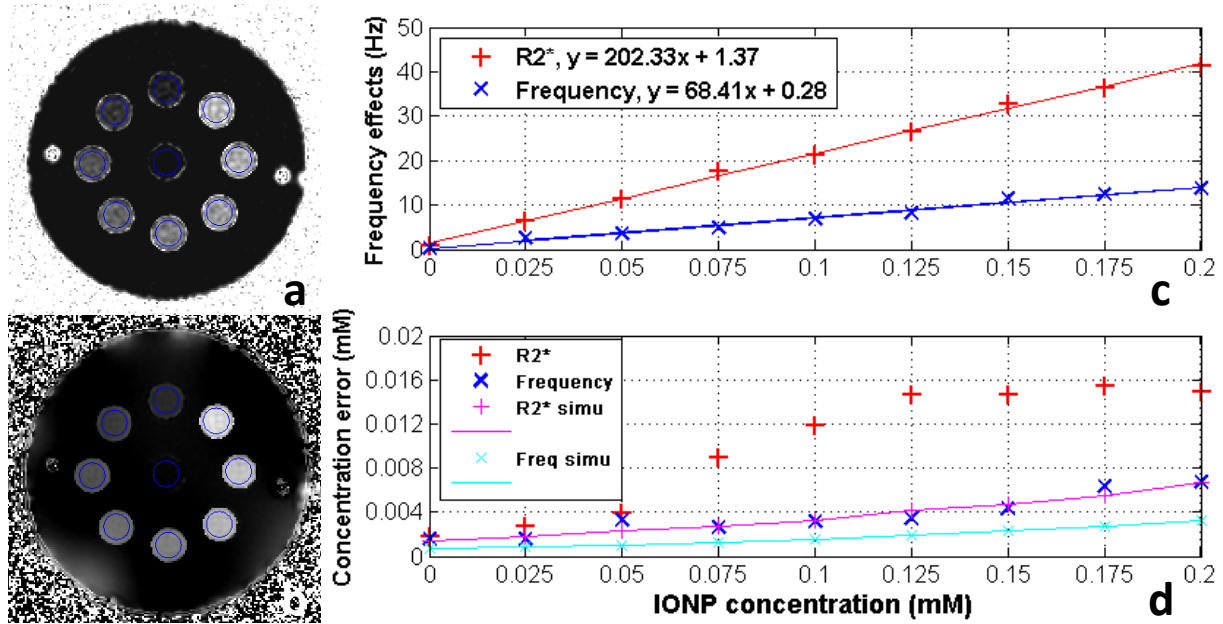


Figure 3.4. Cartes de concentration dérivée de l'amplitude (a) et de la phase (b) pour les IONP. Le  $R_2^*$  et le décalage de fréquence mesurés (c) augmentent linéairement avec la concentration. Leur écart-type sur la concentration (d: points) montre une dépendance avec la concentration. La quantification basée sur la phase présente une erreur plus faible. La simulation (d: lignes solides) donne la même tendance, mais des valeurs plus petites que les valeurs expérimentales suggérant une autre source d'erreur expérimentale non prise en compte.

### 3.1.1.5 Discussion et Conclusion

Cette étude focalisait sur la précision pour quantifier la concentration d'un agent de contraste *via* la relaxation transversale apparente et le décalage de fréquence induits par deux types d'agent couramment utilisés, le Gd-DOTA paramagnétique et les IONP superparamagnétique. Les résultats indiquent théoriquement et expérimentalement qu'avec un système clinique à 1,5 T associé à des paramètres d'imagerie et un appareillage standards, pour des cylindres orientés dans le sens du champ principal, la concentration dérivée de la phase (décalage de fréquence) est entre 1,5 et 6 fois plus précise que la quantification dérivée de l'amplitude (dispersion de fréquence). La capacité à détecter de petites variations d'agent de contraste dépend de la concentration. La précision sur la concentration de l'agent de contraste, *via*  $R_2^*$  et *via* le décalage de fréquence est meilleure dans la gamme de concentration faible, équivalente à  $R_{2,0}^*$  faible ( $T_{2,0}^*$  long) dans les tissus, indiquant que la précision de ce type de méthode dépend bien du temps caractéristique disponible pour faire la mesure, en plus de la relaxivité molaire de l'agent (équation (1.46)). Dans une telle situation, la durée de vie du signal plus longue conduit à une sensibilité augmentée et une meilleure cartographie aussi bien de décalage et que de dispersion de fréquence. A partir de ces considérations, nos résultats peuvent être extrapolés pour déterminer le seuil de détection des agents de contraste *in vivo*. Un tel seuil de détection peut être estimé par le critère de Rose consistant à  $\sim 5$  fois l'écart-type de concentration (236 - Dahnke 2005). Par exemple, en considération de  $R_2^* \sim 15 \text{ s}^{-1}$  pour le tissu cérébral à 1,5 T (237 - Peters 2007) (équivalent à  $R_2^*$  obtenu avec  $\sim 67 \mu\text{M}$  d'IONP), les paramètres d'acquisition employés ici pourraient fournir un seuil de détection de l'ordre de  $\sim 16 \mu\text{M}$  par la cartographie de  $R_2^*$  et  $\sim 6 \mu\text{M}$  par la

cartographie de fréquence en utilisant des IONP. Pour comparaison, Dahnke *et al.* a obtenu une limite de détection similaire de l'ordre de  $\sim 40 \mu\text{M}$  dans le cerveau *in vivo* à 3T avec des IONP et de la cartographie  $R_2^*$  (236 - Dahnke 2005). Outre l'influence de  $R_{2,0}^*$  du tissu sur la précision, la contribution additionnelle du RSB à la détection peut aussi être considérée. En particulier, les paramètres de séquence peuvent être optimisés pour réduire encore les seuils de détection en augmentant la taille du voxel et/ou le temps d'acquisition effectif du signal. Ici, les acquisitions avec les tailles de voxels standards pour de l'imagerie 2D ( $\sim 11 \mu\text{L}$ ) et un temps d'acquisition de 1,4 min a été utilisées. En pratique, le RSB d'une image pourrait être amélioré en utilisant les effets  $T_1$ . Pour rendre les résultats non-biaisés par ce paramètre, nous n'avons pas utilisé cet effet dans cette étude sur fantôme.

Les résultats présentent un accord satisfaisant entre les écart-type mesurés et simulés pour le Gd-DOTA. La dépendance de la précision sur la concentration de l'agent de contraste a également été vérifiée pour les IONP, bien que la précision expérimentale se soit avérée légèrement moins bonne que la théorie. Cela pourrait être liée à la dispersion et aux décalages de fréquence plus faibles compte tenu des concentrations testées (arrivant au maximum à 40 Hz, alors que jusqu'à 150 Hz étaient obtenus pour Gd-DOTA, Figure 3.3 - Figure 3.4). Cela a pu rendre la quantification plus sensible à l'inhomogénéité du champ dû aux sources externes. Le shim a pu également avoir une influence. Les gradients de champ magnétique locaux, par exemple le long de la direction de coupe augmentent la relaxation apparente  $R_{2,0}^*$ . À la place d'une acquisition 2D multi-coupes, des acquisitions 3D avec les dimensions de voxel plus petites devrait réduire ces effets. Il faut noter qu'ici le champ externe n'a pas été compensé ni filtré dans le plan. Afin d'enlever les effets des sources externes, un filtre harmonique peut être appliqué et est capable d'extraire efficacement le champ interne (231 - Schweser 2011).

Ces résultats sur fantôme suggèrent que la reconstruction de carte de susceptibilité QSM pourrait être plus précise que la cartographie  $R_2^*$  pour détecter et quantifier les agents de contraste paramagnétique et superparamagnétique. Les effets ont été ici étudiés dans le cas idéal d'un long cylindre orienté le long de  $B_0$ . La précision de mesure de concentration basée sur la reconstruction QSM nécessite des études supplémentaires pour caractériser complètement la propagation de bruit en considérant le facteur de géométrie (229 - Marques 2005, 230 - Hoffman 2006, 31 - de Rochefort 2008). Les techniques QSM d'inversion régularisée rapide réalisent une déconvolution spatiale *via* une division dans l'espace des fréquences spatiales (226 - Shmueli 2009). Les cartes de susceptibilité magnétique reconstruites dépendent de paramètres de régularisation qui réduisent la propagation du bruit, tout en engendrant des artefacts de reconstruction. D'une manière générale, le décalage de fréquence induit par les agents de contraste contient une information peu exploitée en pratique. Une analyse combinée des effets de phase et d'amplitude dans les séquences en écho de gradient multi-échocs peut idéalement améliorer la quantification et réduire les seuils de détection au bénéfice des applications d'imagerie.

Après avoir analysé la quantification basée sur les effets de relaxation transversale apparente et le décalage de fréquence, nous avons analysé les erreurs dans des méthodes basées sur la quantification de  $R_1$  et  $R_2^*$  sur 2 points, plus réaliste *in vivo*. La quantification  $R_1$  est basée sur une différence pré-post injection d'un agent. La quantification  $R_2^*$  est basée sur l'acquisition de 2 TE. Pour des tissus comme



le parenchyme pulmonaire qui a un  $T_2^*$  court, les précisions entre les deux méthodes sont liées.

### 3.1.2 Quantification par R1

En considérant l'état d'équilibre de l'aimantation dans une séquence « spoiled » et une décroissance exponentielle pour modéliser la relaxation transversale apparente, le signal, en fonction de la concentration de l'agent de contraste  $C$ , est donné par :

$$S(C) = M_0 \sin \alpha \frac{1 - E_1}{1 - E_1 \cos \alpha} E_2 \quad (3.11)$$

avec  $E_1 = \exp(-TR(R_{1,0} + Cr_1)) = E_{1,0}E_{1,C}$  et  $E_2 = \exp(-TE(R_{2,0}^* + Cr_2^*)) = E_{2,0}E_{2,C}$ , si on considère qu'il y a bien linéarité entre le taux de relaxation et la concentration, valable dans la limite d'échange rapide (238 - Schabel 2008).  $R_{1,0}$  et  $R_1$  sont les taux de relaxation longitudinale pré- et post-injection de l'agent de contraste, respectivement, et  $R_2^*$  est le taux de relaxation transversale apparente.  $E_{i,0}$ ,  $E_i$  and  $E_{i,C}$  ( $i = 1, 2$ ) sont utilisés ici pour exprimer les termes exponentiels pré- et post-injection, et la dépendance avec la concentration de l'agent, respectivement.

Pour un agent de contraste paramagnétique, tel que basé sur des chélates de Gadolinium, le mécanisme de contraste  $T_1$  est en théorie prédominant. Après l'administration de l'agent de contraste, un rehaussement relatif de signal (RSE) entre pré- et post-contraste dans une même région d'intérêt (ROI) est observé, et peut ensuite utiliser ce rehaussement de signal pour évaluer la concentration locale. Ce rehaussement relatif RSE est écrit comme  $RSE = S(C)/S_0 - 1$ , où  $S_0$  et  $S(C)$  réfèrent respectivement à l'intensité de signal pré- et post-administration. RSE peut être converti en concentration en utilisant l'équation du signal (3.11):

$$R_1 = -\frac{1}{TR} \ln \left[ \frac{S(C)/S_0(E_{1,0} - 1) + E_{2,C}(1 - E_{1,0}\cos\alpha)}{S(C)/S_0(E_{1,0} - 1)\cos\alpha + E_{2,C}(1 - E_{1,0}\cos\alpha)} \right] \quad (3.12)$$

$$C = \frac{1}{r_1} (R_1 - R_{1,0}) \quad (3.13)$$

La variation du terme transversal  $E_{2,C}$  entre pré- and post-contraste est censé être petite et proche de 1. Les effets de cette approximation sur la quantification seront vérifiés et discutés dans le Chapitre 4.

A partir de cette expression, l'incertitude sur la concentration, résultant de la propagation du bruit, peut être caractérisée par l'écart-type sur  $C$ . Celle-ci est inversement proportionnelle au RSB pré-injection (238 - Schabel 2008) :

$$\sigma_{C,R_1} = \sqrt{\text{var}(C, RSE)} = \frac{1}{RSB \cdot \beta} (E_1 \cos \alpha - 1)^2 \left[ \left( \frac{E_1 - 1}{E_1 \cos \alpha - 1} \right)^2 + \left( \frac{E_{1,0} - 1}{(E_{1,0} \cos \alpha - 1) E_{2,C}} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (3.14)$$

avec  $\beta = r_1 TR E_1 (\cos \alpha - 1) + r_2^* TE (E_1 - 1)(E_1 \cos \alpha - 1)$ . Dans le cas où on néglige la variation des effets transversaux avec  $E_{2,C} = 1$  et pour des faibles concentrations, nous avons :

$$\sigma_{C,R_1} = \frac{\sqrt{2}(1 - E_{1,0}\cos\alpha)(E_{1,0} - 1)}{RSB \cdot r_1 \cdot TR \cdot E_{1,0}(\cos\alpha - 1)} \quad (3.15)$$

Pour avoir un ordre de grandeur, avec  $RSB = 25$ ,  $T_{1,0} = 1$  s,  $TR = 15$  ms,  $\alpha = 30^\circ$ ,  $r_1 = 3,7$  s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>, l'écart-type sur la concentration est de l'ordre de 20 µM par cette méthode.

### 3.1.3 Effet de $R_2^*$ dans les poumons sur la quantification

#### 3.1.3.1 Mesure de $R_2^*$

En considérant le cas de deux échos mesurés pour caractériser le parenchyme pulmonaire, on peut calculer voxel par voxel  $R_2^*$  par :

$$R_2^* = \frac{\ln(Ra)}{\Delta TE} = \frac{\ln(S(TE_1)/S(TE_2))}{TE_2 - TE_1} \quad (3.16)$$

où  $Ra = S(TE_1)/S(TE_2)$  signifie l'atténuation des intensités de signal entre deux échos. En prenant en compte le modèle de signal dans l'équation (3.11), elle peut s'exprimer comme  $Ra = \exp(\Delta TE(R_{2,0}^* + Cr_2^*)) = \Delta E_2$ . La propagation du bruit dans cette estimation donne l'erreur sur  $R_2^*$  :

$$\sigma_{R_2^*} = \sqrt{\text{var}(R_2^*, Ra)} = \frac{\sqrt{1 + \Delta E_2^2}}{RSB \cdot \Delta TE} \quad (3.17)$$

En supposant que  $\text{var}(S(TE_1)) = \text{var}(S(TE_2)) = \left(\frac{S(TE_1)}{RSB}\right)^2$ . Si une quantification pré-post est effectuée avec cette méthode, l'erreur sur l'estimation de concentration serait :

$$\sigma_{C,R_2^*} = \frac{\sigma_{R_2^*}}{r_2^*} = \frac{\sqrt{1 + \Delta E_2^2}}{RSB \cdot r_2^* \cdot \Delta TE} \quad (3.18)$$

En considérant les paramètres typiques pour les poumons de  $RSB = 25$ ,  $T_{2,0}^* = 1,7$  ms,  $TE_1/TE_2 = 0,4/1,4$  ms et  $r_2^* = 5,96$  s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, l'écart-type sur la concentration est de l'ordre de 14 mM par cette méthode. Nous voyons que cette méthode n'est pas adaptée à la quantification de la concentration dans le parenchyme pulmonaire.

#### 3.1.3.2 Simulation des effets de $R_2^*$ avec modèle simplifié

##### 3.1.3.2.1 Modèle de $R_2^*$ dans le poumon

Pour évaluer l'effet de variation de  $R_2^*$  sur la quantification du dépôt d'aérosol à base de l'agent de contraste, une modélisation approximative basée de la compensation de susceptibilité induite par une substance paramagnétique dissoute dans le parenchyme homogène peut être effectuée pour être

comparée (chapitre 4.3.3) avec les résultats expérimentaux.

La géométrie des poumons est complexe, notamment les zones alvéolaires qui constituent la majorité du volume. La différence de susceptibilité magnétique entre l'air et le tissu sont importantes. Par conséquent, la forme du signal dans le parenchyme pulmonaire est complexe (41 - Case 1987). Afin de fournir un ordre de grandeur, nous pouvons adapter un modèle proposé par Yablonskiy et Haacke (239 - Yablonskiy 1994). En considérant le tissu comme une distribution aléatoire de sphères magnétisées, le taux de relaxation de décroissance du signal RMN résultant des variations locales du champ magnétique est proportionnel à la différence de susceptibilité entre l'air et le tissu  $\Delta\chi$ :

$$R'_2 = a \eta \gamma |\Delta\chi| B_0 \quad (3.19)$$

où  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique et  $B_0$  le champ magnétique statique. La fraction volumique du tissu pulmonaire  $\eta$ , qui varie avec l'inflation du poumon, et le facteur de forme  $a = \frac{2\pi}{9\sqrt{3}}$  tiennent compte des paramètres géométriques (239 - Yablonskiy 1994). En supposant que la fraction volumique du tissu alvéolaire est proche de  $\eta \approx 0,42$  (36 - Olsson 2007), et que, avant une administration d'agents de contraste, le tissu est diamagnétique avec  $\Delta\chi = \chi_0 = -9$  ppm, la relaxation transversale apparente est dominée par les effets de susceptibilité dans les poumons et  $R'_{2,0} \approx R'_{2,0}$ . Nous pouvons alors estimer le taux de relaxation apparente à  $R'_{2,0} \approx a \eta \gamma |\chi_0| B_0 \sim 611 \text{ s}^{-1}$ . Si un agent paramagnétique, tel que le Gd-DOTA qui a une susceptibilité molaire  $\chi_m = 310$  ppm/M à 310 K (31 - de Rochefort 2008), est ajouté dans le tissu avec une concentration  $C$ , la susceptibilité globale est augmentée de  $\chi_m C$ . La différence de susceptibilité  $|\Delta\chi| = \chi_0 + \chi_m C$  par conséquent diminue, ce qui tend à réduire la perte de signal lorsque  $C$  est suffisamment petit de ne pas compenser complètement la nature diamagnétique du tissu. La compensation serait obtenue avec  $C < 29$  mM, ce qui est bien plus élevé que ce qui est réalisable en pratique. De ce fait, nous pouvons écrire les effets de susceptibilité comme :

$$R'_2 = |\chi_0 + \chi_m C| a \eta \gamma B_0 = R'_{2,0} - r'_2 C \quad (3.20)$$

où  $R'_{2,0}$  signifie le taux de relaxation induit par la susceptibilité de l'eau dans le tissu et  $r'_2$  est la relaxivité molaire influencée par la distribution locale de l'agent de contraste paramagnétique avec  $r'_2 = \chi_m a \eta \gamma B_0 \sim 21 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . En considérant le taux de relaxation transversale apparente comme la somme de taux de relaxation transversale induit par la susceptibilité et celui intrinsèque, et la relation  $R_2 = R_{2,0} + r_2 C$ , l'équation précédente devient alors :

$$R_2^* = R_2 + R'_2 = R_{2,0}^* + (r_2 - r'_2) C \quad (3.21)$$

où  $r_2 = 3,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  (30 - Port 2008) est la relaxivité molaire de l'agent. Le taux de relaxation apparente est dominé par les effets de susceptibilité, et la relaxivité reste négative :  $r_2^* = r_2 - r'_2 \sim -17,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . La compensation de susceptibilité provenant de l'addition de l'agent paramagnétique dans le tissu tend donc à réduire le taux de relaxation dans le poumon (augmenter la durée de vie du signal). Ce constat théorique est spécifique pour les poumons, car dans la plupart des applications sur d'autres organes le taux de relaxation apparente est toujours augmenté. Il devrait donc y avoir un rehaussement du signal après administration intrapulmonaire d'agent paramagnétique.

3.1.3.2.2 Influence d'une variation  $R_2^*$  sur l'estimation de la concentration par effet  $R_1$ 

Une simulation a été effectuée pour déterminer si les effets  $R_2^*$  peuvent être négligés lors de la quantification de la concentration par rehaussement  $R_1$ , compte tenu des temps d'écho courts qui seront utilisés ( $TE = 0,4$  ms). La simulation a été effectuée dans la gamme de 0 à 1 mM avec le modèle basé sur la compensation de susceptibilité magnétique, qui rend compte de  $R_2^*$  (Figure 3.5). Une réduction progressive théorique de  $R_2^*$  est simulée avec l'augmentation de la concentration de Gd-DOTA. La variation de  $R_2^*$  est faible, moins de 3% de variation sont estimés entre 0 et 1 mM. La variation du RSE induite par l'effet  $R_2^*$  est limitée (le rehaussement dû à la compensation de susceptibilité est négligeable), et la différence entre les modèles d'estimation de concentration avec ou sans prise en compte des effets  $R_2^*$  était inférieure à 0,95% à 1 mM. La concentration estimée variait peu entre les modèles avec ou sans effet  $R_2^*$  (équations (3.12)(3.13)), conduisant à un maximum de 1,27% de surestimation à 1 mM. Par conséquent, avec l'aide de la simulation, la variation du taux de relaxation  $R_2^*$  a un effet négligeable sur RSE et sur la concentration estimée dans une gamme de concentration  $<1$  mM.

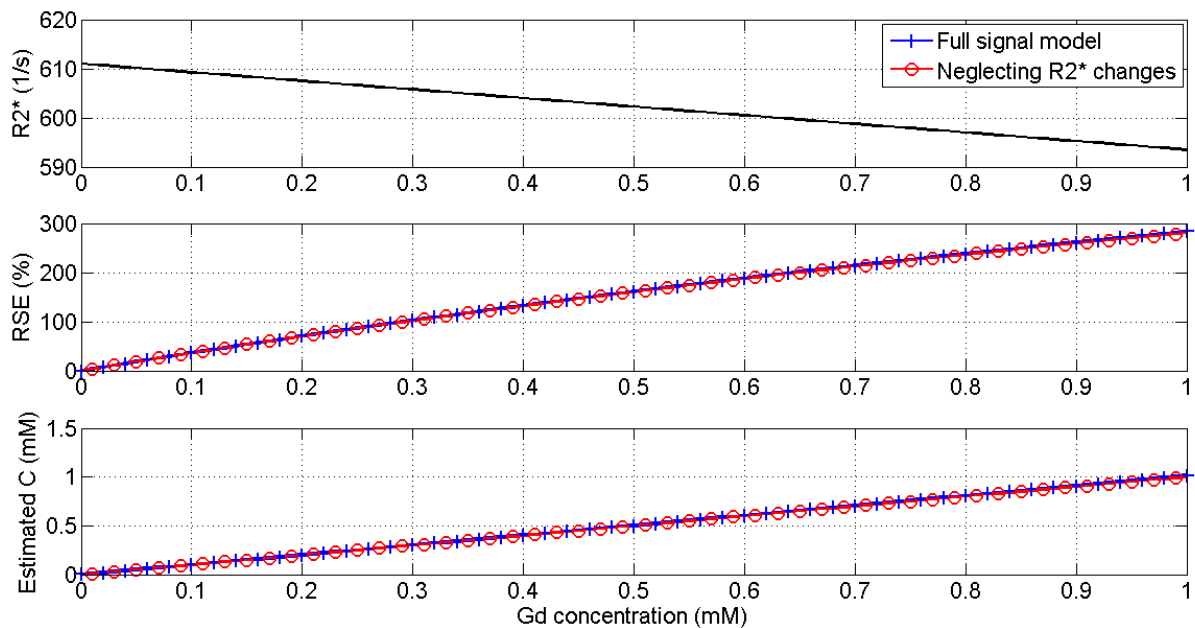


Figure 3.5.  $R_2^*$  ( $s^{-1}$ ), RSE (%) et concentration estimée de l'agent de contraste en fonction de la concentration dans la gamme 0 à 1 mM. Le RSE et la concentration estimés ont été calculés soit par le modèle complet du signal (bleu), soit en négligeant les changements de  $R_2^*$  (rouge). Les variations  $R_2^*$  peut être négligées pour des concentrations inférieures à 1 mM d'après la simulation réalisée des effets de compensation de susceptibilité moyenne du parenchyme pulmonaire.

## 3.2 Caractérisation et mise en place du matériel et des méthodes pour l'imagerie des dépôts d'aérosol chez le rat

### 3.2.1 Caractérisation des aérosols générés par le nébuliseur

La mise en place de la nébulisation des produits dans les poumons de rat nécessite une caractérisation de la taille de l'aérosol, comme décrite dans le chapitre 2.2.2. Nous commencerons donc par une introduction sur le nébuliseur utilisé dans notre étude et sur les propriétés physico-chimiques de différents produits testés. Par la suite, nous nous concentrerons sur les deux approches principales pour mesurer la taille de particules d'aérosol : par impacteur et par diffraction laser.

#### 3.2.1.1 Système de nébulisation

Les agents de contraste ont été aérosolisés à l'aide d'un nébuliseur à maille vibratoire destiné à l'usage clinique chez l'adulte [Aeroneb® Solo; Aerogen, Galway, Ireland]. Pour une solution représentative comme de l'eau, le nébuliseur produit un aérosol avec un taux moyen d'aérosolisation de 0,38 mL/min, et un diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD) de 3,4  $\mu\text{m}$  (Figure 3.6), d'après la note technique du fournisseur.

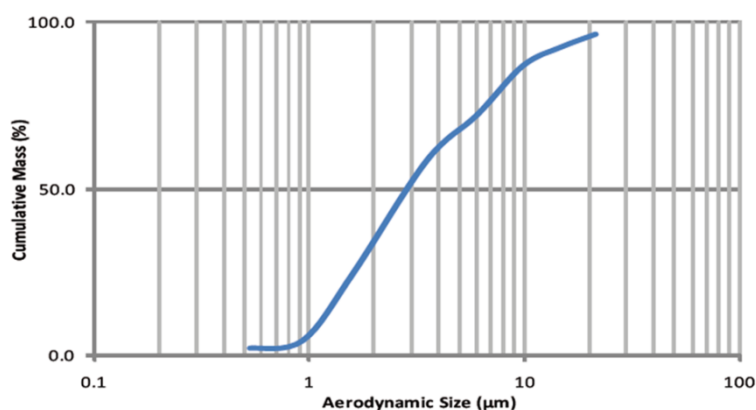


Figure 3.6. La distribution de la taille aérodynamique de l'aérosol par la masse cumulative. Le MMAD pour la nébulisation d'eau était de 3,4  $\mu\text{m}$ .

#### 3.2.1.2 Nébulisation d'aérosol

Comme mentionné plus haut (au chapitre 2.2), l'aérosol est un ensemble de particules en suspension dans un gaz et son dépôt s'effectue par trois effets physiques principaux : l'impaction inertielle, la sédimentation gravitationnelle et la diffusion brownienne. Ces effets sont influencés par nombreuses propriétés physico-chimiques, telles que la taille des particules, la tension superficielle, la pression de vapeur saturante, la solubilité dans l'eau, la viscosité cinétique, la densité du liquide et le débit d'inspiration. Ici, nous comparons quelques produits typiques qui seront utilisés dans les études d'imagerie *in vitro* et *in vivo*. Il s'agit respectivement quatre perfluorocarbones PFCs, et de Gd-DOTA.

Ces quatre PFCs, utilisés pour la plupart dans des applications cliniques, sont respectivement : le perfluorooctyle bromure (PFOB,  $C_8BrF_{17}$ ), le perfluorodécalin (PFDC,  $C_{10}F_{18}$ ), le perfluorooctane (PFOC,  $C_8F_{18}$ ) et le FC770 (mélange des différents PFCs, utilisé comme liquide dans des échangeurs thermiques). Les propriétés principales de ces produits sont résumées dans la Table 3.1.

Acronyme	Nom de l'agent	Formule chimique	$M$ (g/mol)	$p_v$ (pa)	$\rho$ (g/ml)	$\nu$ (cSt)	$\gamma$ (dynes/cm)	$s$ (mg/L)
PFOB	perflubron	$C_8BrF_{17}$	498,96	1466	1,93	x	18	x
PFDC (25°C)	perfluorodécalin	$C_{10}F_{18}$	462,0783	833	1,93	2,94	19,3	x
PFOC (25°C)	perfluorooctane	$C_8F_{18}$	438,06	7466	1,766	0,8	x	x
FC770 (25°C)	3M™ Fluorinert™ Electronic Liquid FC-770	x	399	6568	1,793	0,79	14,8	1,3
Eau (25°C)	Saline solution	$H_2O$	18	3,168	1	1	71.97	x
Gd-DOTA (20°C)	gadoterate meglumine	$C_{23}H_{42}O_{13}N_5Gd$	753,9	x	1,175	1,7– 4	x	x

Table 3.1. Certaines propriétés des produits PFC utilisés et de Gd-DOTA comparés à celles de l'eau. Abréviations :  $M$  : masse molaire moyenne,  $p_v$  : pression de vapeur saturante,  $\rho$  : densité du liquide,  $\nu$  : viscosité cinématique (centistokes (cSt) =  $10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s),  $\gamma$  : tension superficielle (1 dyn/cm = mN/m),  $s$  : solubilité dans l'eau, x : non-applicable.

La taille des particules d'aérosol et le taux d'aérosolisation sont des facteurs importants influençant l'efficacité et les performances du dépôt dans le poumon lors de l'inhalation. Les aérosols générés par le nébuliseur peuvent être caractérisés par le MMAD (chapitre 2.2.2.3). Pour un nébuliseur avec la fréquence déterminée, le MMAD mesuré sur des différents produits dépend notamment des propriétés de la substance à nébuliser, tels que la tension superficielle et la densité (164 - McCallion 1995, 138 - O'Callaghan 1997) : une tension superficielle plus faible et une densité plus élevée pourraient réduire la taille de particules. Pour ce qui est le taux d'aérosolisation de PFC, il dépend principalement de la densité et le débit de l'écoulement entraînant l'aérosol (240 - Rudiger 2004) : une augmentation de débit de l'écoulement ou une densité plus faible de produit pourraient augmenter le taux d'aérosolisation. La pression de vapeur saturante est également un paramètre important sur le taux d'aérosolisation pour les produits PFCs, puisqu'il est possible que le nébuliseur vaporise les PFCs avec une pression de vapeur très faible au lieu de les aérosoliser (240 - Rudiger 2004). La viscosité dynamique (produit de viscosité cinématique par la densité) affecte également la taille de particules et le débit d'aérosolisation. Une solution plus visqueuse est générée en aérosol avec des particules plus larges et avec un débit plus faible (164 - McCallion 1995).

### 3.2.1.3 Réalisation d'un impacteur en cascade pour caractériser l'aérosol

L'impacteur en cascade est une technique standard pour la caractérisation *in vitro* de l'aérosol. Il est basé sur le principe de l'impaction inertielle, pour lequel les fractions des particules d'aérosol sont classées par tailles aérodynamiques liées aux dépôts dans les voies aériennes. C'est une raison importante de l'emploi de cette approche. Pourtant son utilisation est relativement laborieuse et nécessite du temps d'analyse. De plus, ils exigent les conditions de l'utilisation, puisque le débit de l'écoulement traversant les buses d'impacteur influence les tailles d'aérosol caractérisées (241 - de Boer 2002). Ici, nous présentons la conception d'un dispositif d'impacteur adapté à des conditions de ventilation déterminées afin de mesurer les tailles de particules d'aérosol.

#### 3.2.1.3.1 Mise en place de l'impacteur

L'impacteur en cascade est construit par la succession de plusieurs étages d'impaction. Un étage d'impacteur, constitué d'une buse d'entrée dirigeant un jet d'air à haut débit contrôlé contre une surface de collection sous forme de plaque (surface plane, conique ou cylindrique), peut provoquer l'impact des particules supérieures à un certain diamètre de coupure. Chaque étage comporte une buse d'entrée et une surface d'impaction, comme le montre la Figure 3.7.

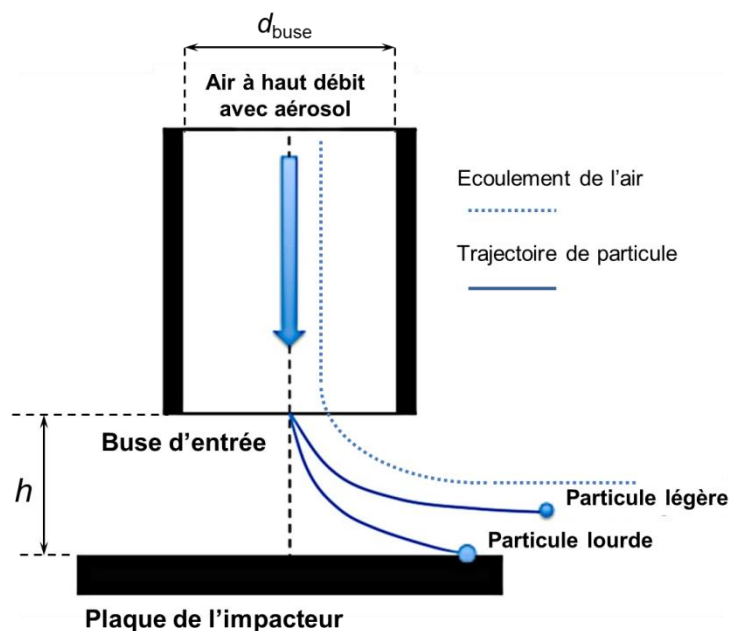


Figure 3.7. Schéma de fonctionnement d'un étage d'impacteur. Les particules ayant une taille supérieure au diamètre de coupure de l'étage s'impactent sur la plaque ; tandis que les particules plus légères traversent l'obstacle et s'impactent sur les étages suivants.

Les aérosols sont délivrés au travers de la buse. Les particules, en raison de leur inertie, ont tendance à effectuer un trajet direct alors que le flux d'air est dévié par un obstacle. Les particules ayant une taille supérieure au diamètre de coupure vont s'impacter sur cet obstacle ; les autres particules, de diamètre plus petit et de vitesse plus élevée, vont continuer la trajectoire et s'impacter sur les étages suivants.

En disposant plusieurs étages de ce type d'impacteur en cascade avec des buses de plus en plus petites et des vitesses de plus en plus élevées, on peut fractionner un ensemble d'aérosol en plusieurs classes. Ensuite la masse recueillie de chaque classe peut être mesurée, dans notre cas par une simple balance électronique de précision.

Le principe de fonctionnement des impacteurs en cascade est expliqué par le mécanisme d'impaction, caractérisée par le nombre de Stokes de la particule (2.30). La taille caractéristique de coupure de l'étage est théoriquement définie comme le diamètre de particule avec 50% de l'efficacité de collection sur cet étage, noté  $d_{50}$ , correspondant à  $Stk_{50}$  (241 - de Boer 2002) :

$$d_{50} = \left( \frac{18\mu d Stk_{50}}{\rho_p \bar{u}} \right)^{0,5} \quad (3.22)$$

où  $d$  est le diamètre de la buse d'entrée.  $Stk_{50}$  est un nombre unique pour une gamme de débit de l'écoulement laminaire ( $500 < Re < 3000$ ). Le critère à respecter est que la distance entre la buse d'entrée ( $h$ ) et la plaque de collection doive supérieure au diamètre de buse circulaire ( $d_{buse}$ ) (Figure 3.7). Sous ces conditions,  $Stk_{50}$  est déterminé à 0,22 (241 - de Boer 2002).

En pratique, les étages d'impacteur sont conçus d'avoir des géométries similaires, construit par une buse cylindrique et une plaque circulaire plane (Figure 3.8a). En collectant successivement des particules plus petites que l'étage précédent, il est donc nécessaire d'augmenter le débit de l'écoulement  $\bar{u}$  et de diminuer  $d$  tous en gardant le même nombre de Stokes ( $Stk_{50}$ ) pour une efficacité de collection constante (50%). Les tests expérimentaux et les calculs théoriques ont été effectués pour déterminer les diamètres convenables  $d_{50}$  pour caractériser les particules aux différents étages basés sur l'équation (3.22) et les diamètres de buses d'entrées correspondants. Un impacteur de quatre étages a été retenu avec des diamètres caractéristiques des particules respectivement : 26  $\mu m$ , 13,6  $\mu m$ , 6,2  $\mu m$ , 3,4  $\mu m$ . Ces plaques d'impaction ont été réalisées par une impression 3D et le diamètre minimal correspondait alors à la limite d'impression (Figure 3.8b). Les modèles à imprimer ont été conçus par logiciel OpenSCAD, un logiciel de modélisation tridimensionnelle open source, et ensuite fabriqué en plastique par dépôt de matière à l'aide de l'imprimante 3D au sein du laboratoire. Celle-ci réalise des dépôts de couches successives de 250  $\mu m$  de diamètre, et se déplace avec environ 100  $\mu m$  de précision dans le plan.

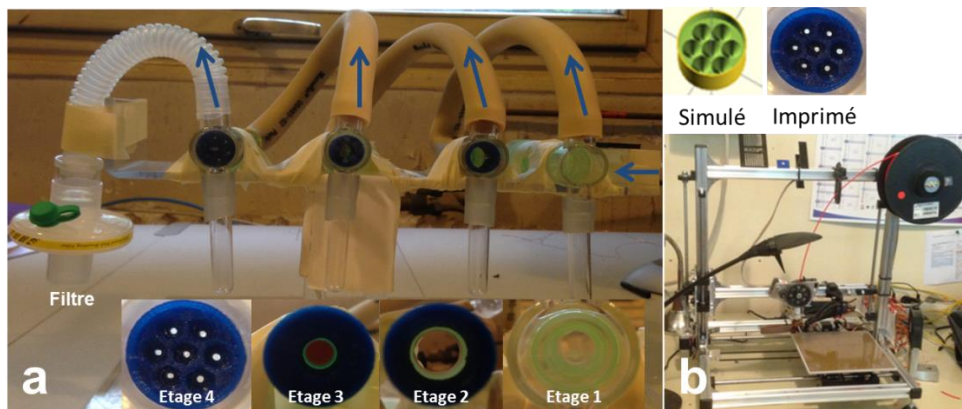




Figure 3.8. (a) Photo de l'impacteur en cascade de 4 étages avec les buses d'entrée (en bas) avec des diamètres diminués. Les flèches bleues montrent le sens d'écoulement de l'air portant l'aérosol. Les tubes connectés aux plaques permettent d'accumuler les particules déposés et un filtre est mis à la sortie de l'écoulement pour stopper les aérosols résiduels. (b) Imprimante 3D et un exemple d'une buse de l'étage 4 simulé et imprimé.

### 3.2.1.3.2 Distribution de la taille des particules par l'impacteur

L'air avec un débit de 15 L/min a été ventilé à l'aide du nébuliseur à maille vibratoire connecté au premier étage de l'impacteur en cascade avant la caractérisation. Lors d'une durée contrôlée de nébulisation, la différence de poids de chaque étage (contenant la buse, la plaque et la tube) a été mesurée respectivement avant et après la nébulisation. La mesure a été effectuée sur deux solutions, l'eau et FC770. Pour chaque solution, l'expérience a été répétée 5 fois et la valeur moyenne a été calculée. D'après les distributions de tailles des aérosols d'eau et de FC770 (Figure 3.9), le MMAD de l'eau est environ 3,4  $\mu\text{m}$  et celui de FC770 est légèrement plus élevé, estimé à 4,5  $\mu\text{m}$ . Il est à noter que les particules inférieures à 3,4  $\mu\text{m}$  n'étaient pas détectables avec le système et le diamètre de l'eau obtenu correspond justement à la taille caractérisée par le fournisseur du nébuliseur. A cause de consommation de solution importante pour la caractérisation, les autres agents n'ont pas pu être caractérisés par cette méthode.

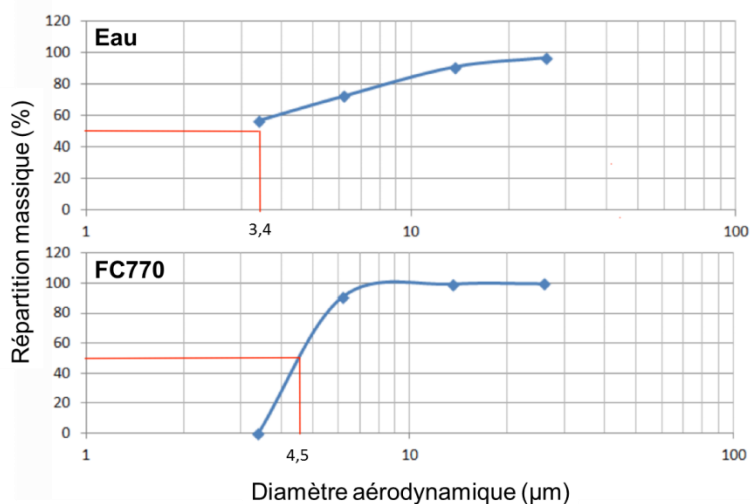


Figure 3.9. Distribution de tailles de particules d'eau et de FC770.

D'après les résultats de répartition de masse cumulative, il semble que la « coupure » (dépôt des particules) soit beaucoup plus rapide pour le FC770, passant de plus de 0% à 90% en un seul étage, alors que la transition est plus lente pour l'eau. Cet aspect indiquerait une distribution plus étroite de taille d'aérosol de PFC liquide. Cela pourrait également être un signe d'une évaporation rapide provoquée par le débit au niveau du dernier étage. Il est donc possible de nébuliser des PFC liquides avec un nébuliseur fait pour des aérosols aqueux, mais le comportement de celui-ci est différent.

### 3.2.1.3.3 Discussion

Un impacteur en cascade est relativement simple à fabriquer pour caractériser les propriétés aérodynamiques des particules, cependant il présente certains défauts techniques. L'efficacité dépend du matériau constituant la surface de collection des particules. Nous avons utilisé les matériaux plastique au lieu du métal conventionnellement utilisé pour ce type d'impacteur, ce qui pourrait diminuer l'efficacité à cause des rebondissements et du réentraînement des particules produits par le mouvement de l'air (242 - Nicolas 2004). Les particules se retrouvent alors sur une plaque inférieure, par conséquent, ce qui ne correspond plus à leur taille nominale. Par ailleurs, les diamètres des buses d'entrée n'étaient pas assez précis à cause de limite de la précision de l'imprimante 3D. L'analyse granulométrique par l'impacteur en cascade conventionnel peut être limitée par ses propres conditions d'utilisations (241 - de Boer 2002), tels que la classification limitée de taille de particules, la dépendance de diamètre de buse avec le débit du gaz, l'électricité statique perturbant, l'évaporation des particules liquides, ainsi que la manipulation longue, laborieuse et non-automatisée. L'impacteur en cascade sert donc dans notre étude à mesurer le MMAD approximatif et à caractériser l'aérosol par impaction. Nous avons pu montrer une différence importante de nébulisation entre de l'eau et de FC770 avec le même nébuliseur. Afin d'avoir accès à une mesure plus précise de la taille des particules pour confirmer nos résultats, une méthode optique comme la diffraction de laser peut être appliquée.

### 3.2.1.4 *Mesure de taille aérodynamique d'aérosols par diffraction laser*

#### 3.2.1.4.1 Principe de diffraction laser

Les méthodes optiques sont liées principalement à l'interaction entre des sources laser et des particules éclairées, correspondant aux lois de la diffusion de la lumière. D'après le rapport entre les dimensions des particules d'intérêt et la longueur d'onde  $\lambda$  de lumière incidente, plusieurs méthodes sont disponibles avec les différents modèles de diffusion, tels que microphotographie, holographie, extinction ou diffraction. Elles permettent des mesures localement, en temps réel, en couvrant une gamme étendue de tailles de particules (dans l'ordre de nm au mm) (243 - Denis 1995).

La diffraction est un phénomène qui se produit lorsqu'un obstacle s'interpose dans la propagation de la lumière incidente. Plus la taille de l'obstacle est étroite, plus la déviation angulaire de la lumière est importante. Cette déviation angulaire est notée  $\theta$  par rapport à la direction de propagation initiale. En considérant des particules comme des obstacles, la mesure consiste donc à analyser la répartition de l'intensité lumineuse diffractée à l'infini (dite diffraction de Fraunhofer). Pour une particule unique sphérique, le profil de diffraction montre typiquement une image d'anneau centrique, qui décroît au fur et à mesure que l'on s'éloigne du centre (Figure 3.10). La diffraction mesurée est donc une superposition de profil de diffraction des particules individuelles. Cette diffraction, ne dépendant que de l'angle de diffusion  $\theta$  et indépendant de la position de particules, est caractérisée par le rayon de l'anneau central :

$$r_0 = f\theta = 1,22\lambda f/2r_p \quad (3.23)$$

où  $f$  est la focale de la lentille et  $r_p$  le rayon de particule.

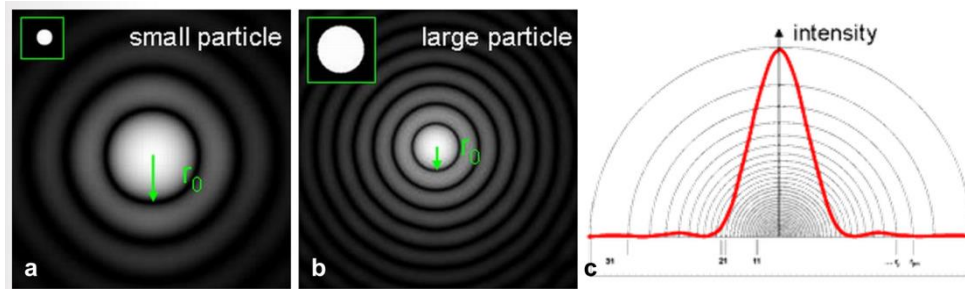


Figure 3.10. Les profils de diffraction d'une particule sphérique fine (a) et large (b) et la distribution d'intensité d'une particule fine détectée par un détecteur photonique semi-circulaire (c). Le rayon de l'anneau central est notée  $r_0$ . Issue de <https://www.sympatec.com/EN/LaserDiffraction/LaserDiffraction.html>

### 3.2.1.4.2 Distribution de la taille des particules par la diffraction

La taille aérodynamique d'aérosols générés par le nébuliseur a été mesurée avec un système à diffraction laser [Helos/BF with Inhaler dispersion module; Sympatec GmbH, Germany] disponible au laboratoire Air Liquide Santé [Centre de Recherche Paris-Saclay, Les Loges en Josas, France] avec la même configuration d'entrée du gaz à 0,8 L/min d'O<sub>2</sub> pur utilisée pour les expériences *in vivo*. Le système mesure le diamètre médian du volume (VMD), moyenné par  $d_{50}$  sur la distribution cumulée de chaque mesure. Les conversions en diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD) est ensuite effectuée par  $MMAD = VMD \times \rho^{0.5}$  en considérant les particules d'aérosol sphérique pleine, c'est-à-dire sans espace interne vide (134 - DeCarlo 2004). La densité ( $\rho$ ) est la densité de la substance par rapport à l'eau. L'écart-type géométrique (GSD) est calculé comme  $GSD = (d_{84}/d_{16})^{0.5}$ , où  $d_n$  est défini de telle sorte que  $n\%$  de volume d'aérosol total est contenu dans les gouttelettes d'aérosol avec diamètres inférieure à  $d_n$  (141 - Martin 2011).

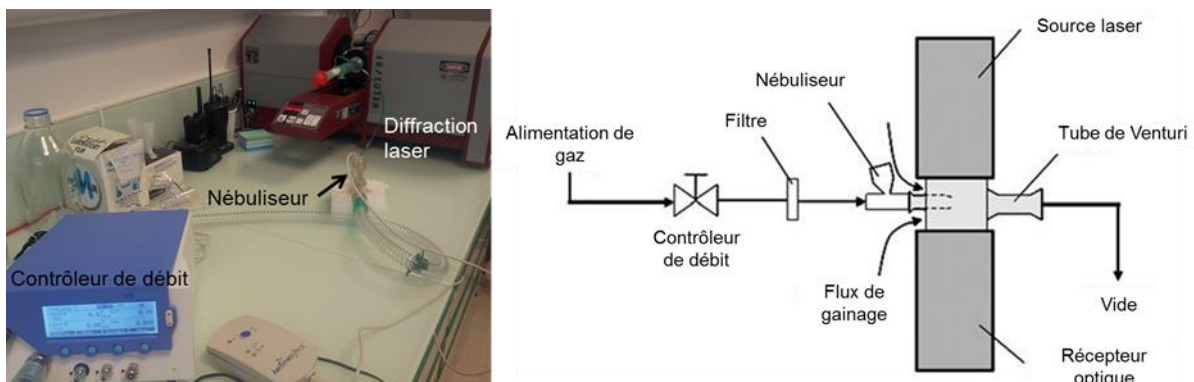


Figure 3.11. Photo du dispositif utilisé pour caractériser la taille de particules par un système de diffraction laser (gauche) et schéma du dispositif expérimental (droite) adapté de (141 - Martin 2011). Le contrôleur de débit permet de régler le flux d'oxygène à 0,8 L/min comme ce qui sera appliqué *in vivo*. Deux configurations sont testées : (i) les tubes, raccord et autres éléments correspondent exactement à la configuration de l'expérience *in vivo* (Photo) ; (ii) le nébuliseur est connecté directement à la chambre de mesure (schéma). La diffraction laser

permet de mesurer directement le diamètre VMD des particules.

La configuration de la ligne du gaz connectée entre le nébuliseur et la chambre de mesure peut influencer les tailles d'aérosol. Par rapport aux particules mesurées à la sortie du nébuliseur, la présence d'une ligne du gaz d'entrée plus complexe rendait la taille des particules plus petite (141 - Martin 2011). Des expériences ont été donc effectuées respectivement avec et sans les raccords et tubes de manière similaire au protocole d'imagerie *in vivo*. La caractérisation de l'aérosol est réalisée par six mesures successives de 60 s, à partir desquelles les tailles de particules mesurées sont distribuées en proportion sur 31 diamètres différents. Cette opération a été répétée deux fois pour chaque configuration. Un écoulement de gainage (sheath air) à 1 mbar correspondant à 3 L/min d'air a été utilisé. Cet écoulement de l'air filtré entourant le flux d'aérosol a pour but de prévenir le dépôt des gouttelettes dans les fenêtres de la chambre de mesure. Un paramètre nommé « concentration optique », décrit la fraction de l'obscurité entre la source laser et les détecteurs photoniques de diffraction laser, qui correspond à la répartition spatiale des particules. Ici, les concentrations optiques moyennes sont entre 10% et 30%.

Les solutions telles que le sérum physiologique, Gd-DOTA, PFOC et FC770 ont été respectivement aérosolisées et mesurées. Les résultats ici sont présentés en moyenne  $\pm$  écart-type, calculé sur 12 mesures répétitives. Le sérum physiologique, considéré comme la densité unité, produisait donc un MMAD de  $3,96 \pm 0,14 \mu\text{m}$  et GSD de  $2,38 \pm 0,04$  dans le cas sans ligne d'entrée ; par rapport au MMAD de  $1,95 \pm 0,16 \mu\text{m}$  et  $1,91 \pm 0,03$  dans le cas avec la ligne d'entrée. Avec une densité de 1,175 g/mL à 293 K, les aérosols à base de Gd-DOTA étaient délivrés au rat avec un MMAD de  $2,46 \pm 0,20 \mu\text{m}$  et GSD de  $1,54 \pm 0,02$ . Sans la ligne d'entrée du gaz, son MMAD et GSD étaient respectivement  $4,96 \pm 0,22 \mu\text{m}$  et  $1,88 \pm 0,09$ .

En ce qui concerne les solutions de PFC, les tailles de particules étaient apparemment plus larges. Ayant une densité 1,766 g/mL à 298K, les particules de PFOC nébulisés avait un MMAD comparable avec ou sans la configuration de l'entrée du gaz, soit  $7,64 \pm 0,02 \mu\text{m}$  vs.  $7,73 \pm 0,02 \mu\text{m}$  ( $n = 6$ ), ainsi qu'un GSD comparable de  $1,44 \pm 0,01$ . FC770 possède une densité de 1,793 g/mL (298K), permettant de générer les particules les plus larges avec la ligne d'entrée avec un MMAD de  $7,85 \pm 0,04 \mu\text{m}$  et un GSD de  $1,43 \pm 0,08$  ( $n = 8$ ). En branchant le nébuliseur directement, la taille MMAD de particules de FC770 était  $7,08 \pm 0,29 \mu\text{m}$  avec GSD  $2,02 \pm 0,08$  ( $n = 3$ ).

#### 3.2.1.4.3 Discussion

Par rapport à l'impacteur, la méthode optique est considéré plus rapide et précise (241 - de Boer 2002). Cependant certaines limites sont toutefois présentes, tels que la mesure géométrique au lieu de la taille aérodynamique, la difficulté de mesure sur des particules de faible concentration, ainsi que la gamme de mesure largement supérieure à la distribution de particules pharmaceutiques.

En ajoutant une ligne du gaz d'entrée, les tailles des particules mesurées réduites ont été observées pour l'eau et le Gd-DOTA, ce qui correspond à un effet de filtrage. Pourtant, ces effets n'étaient pas

présents pour les produits PFC, une possibilité est que la distribution de tailles de particules fluorées soit plus étroite, ce qui rend le filtrage moins important.

Comparés aux résultats obtenus par l'impacteur (eau et FC770), des tailles plus larges ont été mesurées par la diffraction laser. L'impacteur n'a que quatre classes de tailles pour caractériser, largement inférieures au nombre de classes par laser (31 diamètres différents), ce qui pourrait limiter le résultat mesuré par l'impacteur. La simplicité de manipulation et les mesures robustes et reproductibles par la diffraction laser rendent la caractérisation d'aérosol plus précise.

Comme décrit dans le chapitre 3.2.1.2, les propriétés physicochimiques affectent effectivement les tailles d'aérosol. La corrélation positive entre la viscosité et la taille de particule correspond aux résultats entre l'eau et le Gd-DOTA. Avec une densité comparable à l'eau, le Gd-DOTA plus visqueux génère un aérosol avec des tailles plus larges. Pourtant, les résultats de PFC ne correspondaient pas à cette proportionnalité, ce qui suggère que les autres propriétés spécifiques de PFC interviennent dans la génération d'aérosol.

Avec la configuration d'entrée de gaz ajouté, un MMAD de 2,46  $\mu\text{m}$  pour Gd-DOTA a été mesuré. D'après la Figure 2.10 pour cette gamme de diamètre, une fraction du dépôt de ~50% dans la région extrathoracique et de ~15% dans la région alvéolaire est prédite. En ce qui concerne les PFCs, un diamètre aérodynamique moyenne de ~7  $\mu\text{m}$  correspond donc à un dépôt ~90% dans la région extrathoracique et ~5% dans la région alvéolaire. Sachant que PFC a une évaporation rapide, l'efficacité du dépôt de PFC dans les poumons pourrait être délicate.

### **3.2.2 Imageur clinique**

Les expériences effectuées au cours de cette thèse ont été principalement effectuée sur un appareil clinique multi-noyaux de 1,5T [Achieva; Philips Healthcare, Best, The Netherlands] (Figure 3.12). Cet imageur est une plateforme de recherche, copropriété du CNRS, de l'université Paris-Sud et du CEA localisée dans le service hospitalier Frédéric Joliot (CEA/DSV/I2BM/SHFJ). Cet imageur est équipé d'un aimant horizontal cylindrique supraconducteur. Il est équipé d'une antenne quadrature d'émission/réception (Q-body), et d'un système de réception 32 canaux pour le proton. Un émetteur large bande permet d'exciter d'autres noyaux, et des cartes de réception particulières sont disponibles pour des noyaux ayant des fréquences plus basses.



Figure 3.12. Imageur Philips Achieva 1,5 T utilisé dans ce travail.

### 3.2.3 Installation de l'animal dans l'imageur

Pour permettre une certaine reproductibilité de la position, d'une part tout au long de l'expérience chez un même rat, mais aussi entre animaux, un support dédié a été fabriqué au sein du laboratoire (Figure 3.13). Les rats étaient immobilisés en position couchée sur le ventre dans ce support.

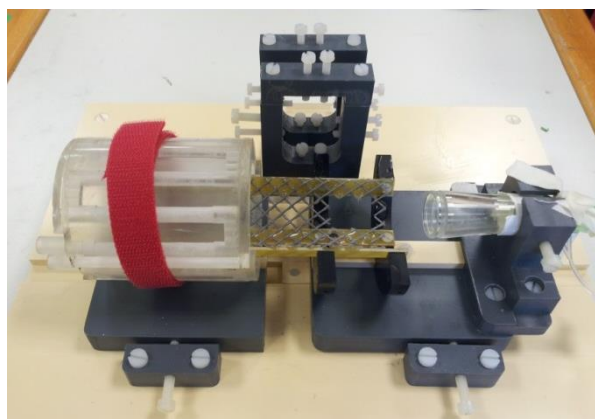


Figure 3.13. Photo de support spécifique fabriqué au sein du laboratoire. Il permet d'immobiliser le rat tout au long de l'imagerie. Le cône de ventilation est visible sur la droite. Un système de circulation d'eau chaude (à 40°C) utilisé pour maintenir l'animal au chaud lors de l'anesthésie est visible sur la gauche. Les antennes pouvaient être fixées à l'aide d'un système de vis visible à l'arrière.

Les rats avaient une phase d'induction d'anesthésie avec un mélange gazeux (isoflurane et O<sub>2</sub> pur) dans une chambre d'induction, et étaient ensuite gardés anesthésiés pendant la durée de l'expérience avec le mélange d'isoflurane et d'O<sub>2</sub> délivré à travers un cône adapté sur le nez [Rothacher Medical GmbH, Heitenried, Switzerland]. Ils étaient maintenus à la température corporelle à l'aide d'une circulation d'eau chaude à 40°C. Leurs profils respiratoires étaient surveillés à l'aide d'un ballonnet

inclus à un système de monitoring pour petit animal [Model 1030; SA Instruments Inc., Stony Brook, NY]. Un nébuliseur à maille vibratoire [Aeroneb® Solo; Aerogen, Galway, Ireland] était inséré dans la ligne d'entrée du gaz anesthésiant juste avant le cône du nez à l'intérieur de l'IRM. Les mesures par IRM étaient effectuées avec l'animal positionné perpendiculairement au champ magnétique statique. Le rat était inséré dans une sonde RF circulaire adaptée à sa taille, placé au milieu des poumons et qui était centré dans le système d'IRM. Les impulsions radiofréquence étaient appliquées avec l'antenne corps-entier intégrée en mode de transmission séparé de la réception.

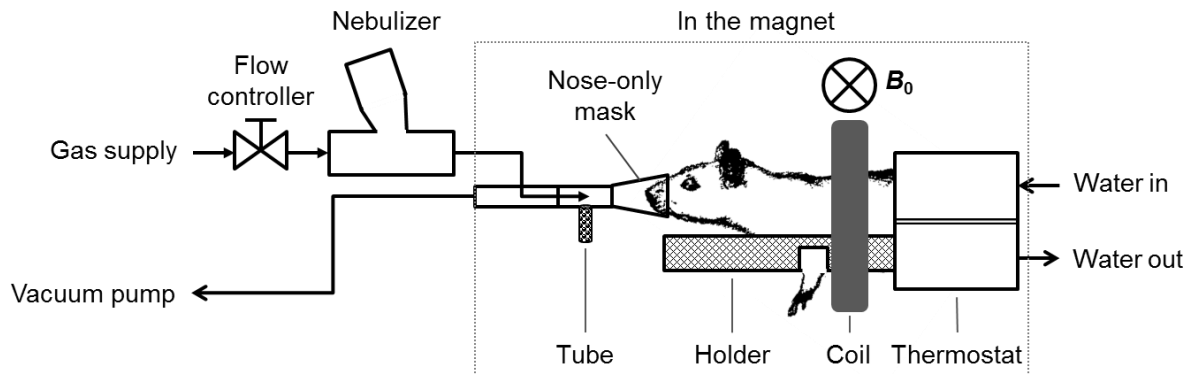


Figure 3.14. Schéma du dispositif expérimental. Le rat respire spontanément un mélange de gaz anesthésiant (isoflurane et O<sub>2</sub>) à un débit contrôlé à travers un masque adapté au nez de l'animal. Un petit tube était ajouté juste avant le cône pour permettre d'éviter l'accumulation de potentiel liquide condensé. Le nébuliseur était inséré dans la ligne d'entrée du gaz. L'animal était immobilisé dans le support, passant à travers une antenne RF circulaire de réception.

### 3.2.4 Spécificité de la séquence UTE

Les séquences d'UTE ont été développées pour visualiser les tissus avec un  $T_2^*$  très court. Ces séquences peuvent utiliser une excitation sélective particulière et un remplissage radial de l'espace  $k$  en  $k_x$ ,  $k_y$ , et  $k_z$  pour atteindre des TE dans la gamme 50 à 500  $\mu$ s (51 - Robson 2003).

Dans l'étude *in vivo* chez le rat, une séquence radiale 3D UTE isotrope pondérée en  $T_1$  était appliquée avec les paramètres suivants : TR/TE = 14/0,4 ms, 30° d'angle de basculement, 64 mm isotrope de champ de vue FOV, (0,5 mm)<sup>3</sup> de résolution spatiale. La séquence 3D UTE contient une impulsion RF rectangulaire ayant une durée de 89,6  $\mu$ s. Le temps d'écho est défini ici comme le temps entre la fin de l'impulsion RF et le début de l'acquisition. Les gradients d'imagerie comprenaient un trapèze (avec une rampe de 479  $\mu$ s et un plateau de 2,2 ms). Avec une bande de passante d'acquisition de 255 Hz par pixel, 144 points d'acquisition étaient échantillonnés à chaque répétition. Le gradient de lecture était complètement refocalisés pendant l'application d'un gradient de spoiling. La pondération en  $T_1$  était rehaussée au moyen de spoiling RF avec une transition de phase quadratique avec un incrément de 150°. Le codage radial était accompli avec un ordre de remplissage radial 3D dit « Koosh-ball » défini dans (244 - Wong 1994), contenant 32770 directions radiales échantillonnant une sphère relativement uniformément. Avec une excitation unique (Nex=1), le temps d'acquisition total était 7 min 29 s par volume. La reconstruction était effectuée avec des voxels isotropes de 250  $\mu$ m par le logiciel Philips,

en désactivant d'éventuelles corrections de phase et avec un stockage des images en échelle absolue dans les fichier DICOM permettant d'avoir toujours le même signal pour les acquisitions chez un même rat ainsi qu'entre les différents animaux.

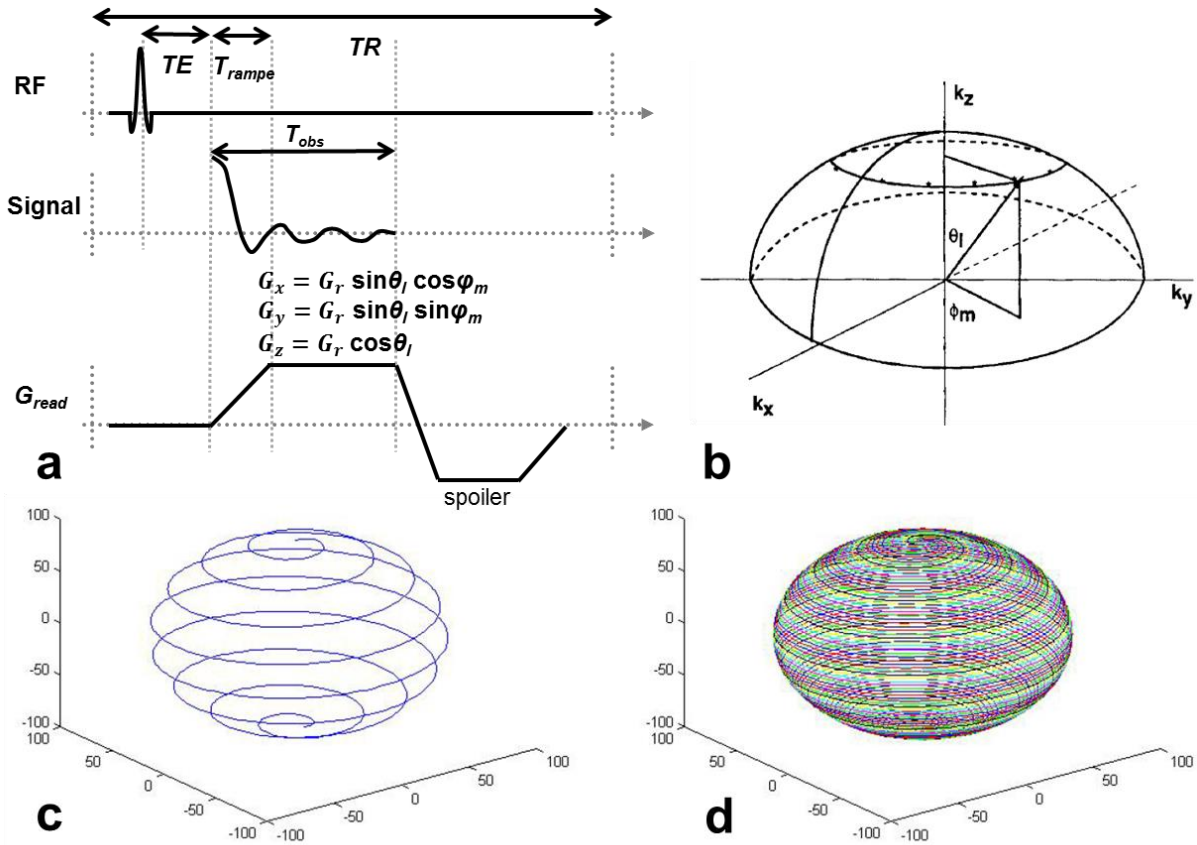


Figure 3.15. Chronogramme de la séquence 3D UTE radiale (a) avec TE défini ici comme le temps entre la fin de l'impulsion RF et le début de l'acquisition. L'échantillonnage de l'espace  $k$  couvre uniformément le volume sphérique (b, extrait de (245 - Glover 1992)). La trajectoire spirale sur la sphère (remplissage Kooshball), avec présentation d'une seule spirale (c) et de toutes les spirales dans le cas de 3277 points par spirale et 10 spirales (d).

Le chronogramme de la séquence UTE 3D isotrope radiale est montré sur la Figure 3.15a. Le gradient de lecture est réorienté en dynamique. L'acquisition commence simultanément avec l'augmentation de la rampe et à la fin de la lecture après un temps  $T_{obs}$  la coordonnée est localisée à  $(k_0, \theta_l, \phi_m)$  (Figure 3.15b). Les fréquences spatiales les plus élevées sont à une distance égale à  $k_0 = \gamma G_r (T_{obs} - T_{rampe}/2)$ . Les points sont uniformément placés selon l'azimute ou l'élévation, en choisissant une densité convenable d'échantillonnage. Les trajectoires spirales sont montrés schématiquement sur les Figure 3.15 c&d.



### 3.2.5 Mise en place et caractérisation de l'antenne

#### 3.2.5.1 Antenne proton standard utilisée

Lors des expériences proton *in vivo*, une sonde de réception circulaire de 47 mm de diamètre interne (une des sondes dites « microscopiques » standard fabriqué par Philips) était utilisée (Figure 3.16). Cette sonde circulaire est normalement destinée à l'imagerie de la peau, de l'œil, des petites articulations, des vaisseaux superficiels, des mamelons ou des articulations temporo-mandibulaires. Elle permet de réaliser l'imagerie avec un petit champ de vue et d'obtenir ainsi des résolutions élevées avec un bon RSB. Lors de notre expérience *in vivo*, elle s'est avérée adaptée à la taille des rats Wistar de poids inférieur à 350 g.



Figure 3.16. Antenne de réception circulaire utilisée pour les expériences d'imagerie du proton à 1,5 T.

#### 3.2.5.2 Antenne double résonance $^{19}\text{F}/^1\text{H}$

L'imagerie des produits à base de molécules fluorées sous forme d'aérosol ou de gaz serait une solution alternative pour quantifier les dépôts d'aérosol ou la ventilation dans le poumon (59 - Ruiz-Cabello 2011). Pour obtenir des éléments de faisabilité d'une telle approche, une sonde double résonance aux fréquences du fluor ( $^{19}\text{F}$ ) et du proton ( $^1\text{H}$ ), et adaptée à l'imagerie des poumons de rat à 1,5T, a été développée. Le protocole de nébulisation et d'imagerie a été élaboré sur des fantômes et la faisabilité de l'IRM double-noyaux fluor-proton pour imager la ventilation et caractériser le devenir des aérosols à base de molécules fluorées a été testée sur fantôme et *in vivo*.

Pour tester la faisabilité d'une technique d'imagerie à base d'agents fluorés dans les poumons du rat, nous avons besoin des images de proton et de fluor tout en gardant la même position de l'animal pour pouvoir ensuite co-localiser les tissus et les molécules fluorées. Nous avons donc conçu et fabriqué une antenne double résonance adaptée au poumon de rat à 1,5T et utilisée en mode émission/réception.

##### 3.2.5.2.1 Schéma de principe du résonateur

On rappelle que les fréquences de Larmor du fluor  $f_{^{19}\text{F}} = 60,12 \text{ MHz}$ , et du proton  $f_{^1\text{H}} = 63,87 \text{ MHz}$ , à 1,5 T sont proches. L'antenne double résonance retenue doit donc exciter et recevoir le signal pour ces fréquences proches. De plus, celle-ci doit pouvoir être adaptée simultanément à

l'impédance des émetteurs et des récepteurs aux différentes fréquences. Il existe plusieurs méthodes pour créer une antenne double fréquence, parmi lesquelles deux résonateurs fortement couplés est utilisée plus souvent. Dans notre cas où ces deux fréquences sont très proches (60,12 MHz et 63,87 MHz), il faut bien contrôler le couplage entre les deux résonateurs. Ici, la méthode « coupling tank circuit » (246 - Muftuler 2002) a été appliquée, pour laquelle le schéma électronique est montré sur la Figure 3.17.

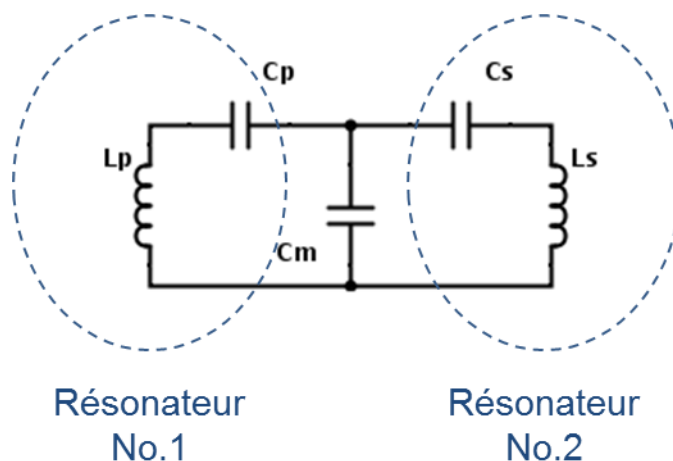


Figure 3.17. Configuration « coupling tank circuit ». Chacun de deux résonateurs contient une capacité et une inductance en série. Les fréquences de résonance des deux résonateurs sont à peu près identiques et réajustables avec des capacités variables. Le couplage entre les résonateurs est ici réalisé par la capacité de couplage  $C_m$ .

Nous nous sommes basés sur le concept de résonateurs en sur-couplage possédant deux modes, commun (basse fréquence) et différentiel (haute fréquence). L'un des résonateurs contient une inductance circulaire couplant donc à l'environnement et produisant le champ  $B_1$  effectif pour l'imagerie. L'autre résonateur correspond à une inductance torique avec un champ confiné à l'intérieur. Ainsi, la même géométrie de champ  $B_1$  est produite aux deux fréquences. Dans cette configuration, la deuxième résonateur est appelé « circuit de réserve » ou « tank ».

Le couplage devient plus important lorsque la valeur de  $C_m$  diminue, la courbe de résonance change d'un seul pic de résonance en cas de « sous-couplage » à deux pics de résonance en cas de « sur-couplage » (Figure 3.18). En pratique, la fréquence de résonance de résonateur No.1 et No.2 est d'abord accordée à la fréquence de résonance du fluor à 60,12 MHz ; puis la fréquence de résonance du proton est retrouvée à 63,87 MHz, par réglage de la valeur de la capacité de couplage  $C_m$ .

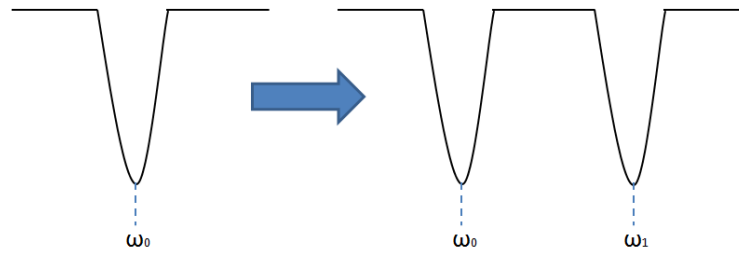


Figure 3.18. Schéma de l'absorption dans le système illustrant le changement d'une seule résonance vers deux pics de résonance en cas de « sur-couplage ». Il faut noter que la pulsation de Larmor  $\omega_1$  est toujours plus grande que  $\omega_0$ .

Pour la réalisation, la bobine de transmission indiquée sur la Figure 3.17 par l'inductance  $L_p$  a été fabriquée avec du fil de cuivre émaillé (diamètre du fil  $\varnothing_f = 2,5$  mm) et sous forme de boucle circulaire (deux tours de diamètre  $\varnothing_b = 47$  mm). Le diamètre de la boucle a été choisi le plus petit possible, adapté à la taille de rat et identique à la sonde commerciale proton. Enfin, l'inductance est proportionnelle ici au carré du nombre de spires, de sorte qu'on peut déterminer la valeur des condensateurs à partir de la formule de résonance ci-dessous :

$$f_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \quad (3.24)$$

où  $f_0$  est la fréquence de résonance du résonateur,  $L$  est l'inductance et  $C$  la capacité d'accord. L'inductance de la bobine mesurée était environ de 350 nH et  $f_0$  égale à la fréquence de fluor (60,12 MHz). En considérant l'inductance du circuit, la valeur du condensateur  $C_p$  doit être d'environ 20 pF. En pratique, un condensateur constant de 10 pF et un condensateur amagnétique réglable de 1 à 13 pF en parallèle ont été utilisés pour obtenir la capacité nécessaire  $C_p$  avec une certaine gamme de réglage possible.

Pour le résonateur No.2, l'inductance était une bobine solénoïde sous la forme d'un tore ( $\varnothing_b = 10$  mm, 16 spires) de cuivre émaillé ( $\varnothing_f = 2,5$  mm). Cette bobine permettait de prendre moins de place, d'avoir la même inductance que le résonateur No.1, et de ne pas coupler à l'extérieur (absence du champ radiofréquence induit). La même combinaison de condensateur que  $C_p$  a été mise en place pour réaliser la capacité d'accord  $C_s$ , soit un condensateur constant de 10 pF et un condensateur amagnétique réglable de 1 à 13 pF en parallèle.

La différence entre les deux fréquences de résonance augmente avec l'impédance de couplage (diminution de  $C_m$ ). La valeur de  $C_m$  peut être calculée par l'équation suivante :

$$\omega_1 = \omega_0 \sqrt{1 + (C_p + C_s)/C_m}, \quad (3.25)$$

dans laquelle la fréquence de résonance du fluor  $\omega_0/2\pi$  égale à 60,12 MHz, la fréquence de résonance du proton  $\omega_1/2\pi$  égale à 63,87 MHz et les valeurs des deux condensateurs  $C_p$  et  $C_s$  sont environ 15 pF. En pratique, deux condensateurs constants de 220 pF et 18 pF et un condensateur amagnétique

réglable de 1 à 13 pF en parallèle ont été utilisés pour effectuer la capacité d'accord  $C_m$  égale à environ 233 pF.

Le tout a été soudé sur une plaque du circuit imprimé. Le prototype d'antenne est présenté sur Figure 3.19.

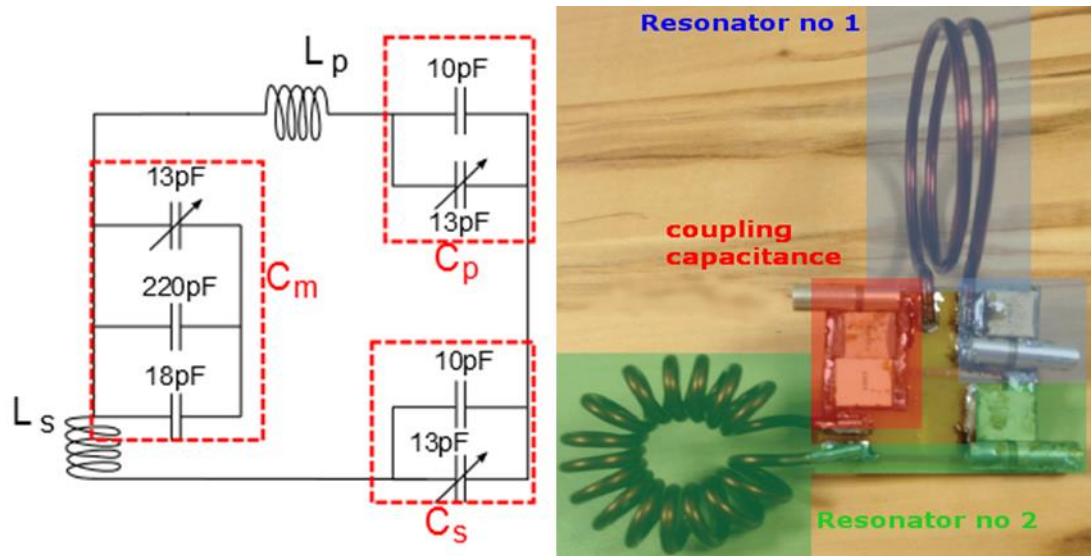


Figure 3.19. (a) Circuit électronique pour réaliser l'antenne double résonance. (b) Photo de l'antenne fabriquée.

### 3.2.5.2.2 Adaptation de l'impédance du résonateur

Pour adapter l'impédance de sortie à l'amplificateur de puissance, l'impédance du système RF doit être adaptée à 50 ohms ( $\Omega$ ). En théorie, cette adaptation est réalisée pour chaque fréquence. La proximité des fréquences nous a permis d'utiliser un circuit de couplage unique pour les deux fréquences. Nous avons mis en place un système d'adaptation d'impédance par couplage inductif (Figure 3.20). L'idée est de régler l'impédance mutuelle entre une boucle de couplage « pick-up coil » et notre antenne par la modification du coefficient de couplage *via* la position entre le résonateur et la boucle de couplage. Après plusieurs essais de géométrie de couplage, une boucle de couplage en forme de « huit » a été retenue pour augmenter la surface mutuelle avec le résonateur et utiliser les effets combinés des deux côté du résonateur circulaire. Sa forme courbée permettait de plus au rat d'être positionné sur le support sans contact entre la boucle et l'animal, mais permettant tout de même d'obtenir un couplage suffisant à l'adaptation d'impédance.

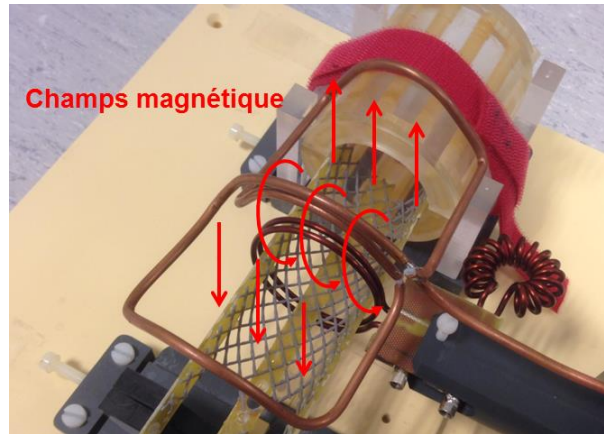


Figure 3.20. Schéma de l'antenne double résonance réalisée et de la boucle de couplage inductif en forme de huit (champ magnétique induit illustré par les lignes rouges). Le dispositif est installé dans le support utilisé pour l'imagerie du rat.

### 3.2.5.2.3 Caractérisation électrique du résonateur

La mesure de facteur de qualité (facteur  $Q$ ) d'une antenne vide ou chargée par un échantillon permet de caractériser l'antenne. Le facteur de qualité pour un résonateur avec une fréquence unique correspond à la bande passante :

$$Q = \frac{\omega_0}{\Delta\omega} \quad (3.26)$$

où  $\omega_0$  est la fréquence à laquelle le gain est maximal et  $\Delta\omega$  est la bande passante à -3dB, c'est-à-dire quand la tension de sortie est réduite d'un facteur racine de 2 par rapport au gain maximal. Un fort facteur de qualité correspond à une bande de passante étroite et limite les bruits collectés. Par expérience, le facteur de qualité d'un mono-résonateur à ~60 MHz en cuivre à 293 K est dans l'ordre de  $Q_{\text{parfait}} = 10 \times \text{diamètre de bobine (en millimètre)}$  dans le cas idéal, lorsque celui-ci est mesuré (sans adaptation de l'impédance). Dans le cas d'une mesure adaptée à 50  $\Omega$ , le facteur de qualité est divisé par 2. La géométrie utilisée n'est pas idéale d'un point de vue du bruit puisqu'une partie des pertes électriques se produit dans le résonateur « tank ». La formule du facteur de qualité, valable pour un mono-résonateur, a été également utilisée pour caractériser le résonateur dans notre cas. Le facteur de qualité de l'antenne adapté à 50  $\Omega$  était 250 en moyenne sur les deux fréquences. Sachant que le facteur de qualité idéal  $Q_{\text{parfait}}$  est environ 470, nous avons considéré que l'antenne avait une qualité acceptable. La Figure 3.21 présente un profil d'absorption dans l'antenne avec ses deux fréquences de résonance et une bonne adaptation d'impédance avec la solution de couplage inductif retenue.

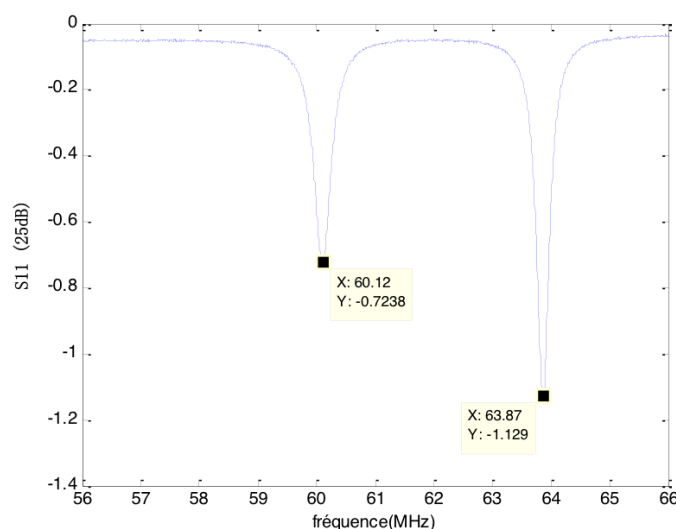


Figure 3.21. Les deux pics de fréquence de résonance mesurés par un analyseur de réseau correspondant aux fréquences du fluor et du proton à 1,5T. L'échelle de l'absorption  $S_{11} = 1$  correspondait à 25 dB. Une adaptation de -15dB est en pratique acceptable.

#### 3.2.5.2.4 Caractérisation in vitro de l'antenne

Dans un premier temps, des fantômes contenant des échantillons purs de PFOB, PFOC, PFD, Isoflurane, FC770 et eau, étaient utilisés afin de tester l'antenne double-résonance développée. De plus, cela nous a permis d'optimiser les paramètres d'acquisition et déterminer la sensibilité des PFCs pour les expériences *in vivo* par la suite.

Une séquence 3D en écho de gradient avec les paramètres suivants a été appliquée *in vitro* : un temps de répétition  $TR = 6,58$  ms, un temps d'écho  $TE = 4,8$  ms, un champ de vue  $FOV = 164\text{mm} \times 164\text{mm} \times 64\text{mm}$ , un voxel isotrope de 1 mm, une bande passante par pixel de  $BW = 1563$  Hz (permettant une réduction des artéfacts de décalage chimique) et un angle de bascule  $\alpha = 5^\circ$ . Les RSB (mesurés comme la moyenne du signal sur l'écart-type du bruit) étaient respectivement de 41,1 pour PFOC, 34,6 pour l'isoflurane, et 55,6 pour le FC770 (Figure 3.22).

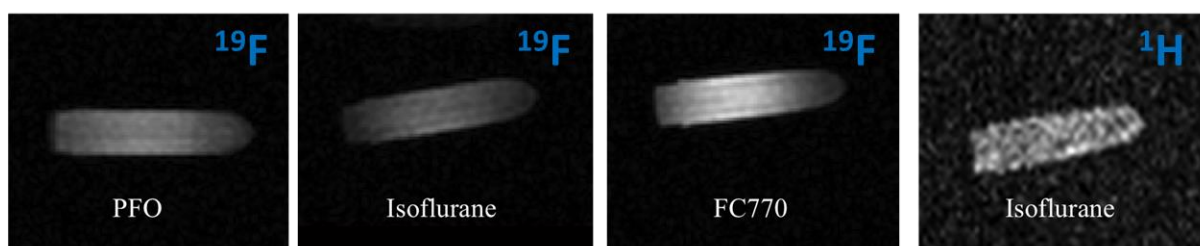


Figure 3.22. Images de différents échantillons des PFCs. En fluor ( $^{19}\text{F}$ ), des échantillons PFOC, isoflurane et FC770 montraient des images de qualité correcte. L'image en proton ( $^1\text{H}$ ) a été obtenue sur l'isoflurane.

Par la suite, deux seringues (38 mm de diamètre) ont été remplies de 70 ml de  $\text{SF}_6$  et de 70 ml d'eau du robinet, afin de comparer les sensibilités avec des séquences optimisées pour ces deux molécules. Tout d'abord, le temps de relaxation transversale  $T_2^*$  du  $\text{SF}_6$  à 1,5 T a été caractérisé via une mesure

spectroscopique d'un signal de précession libre (FID)  $T_2^* = 3$  ms.

Une séquence UTE a été mise en place pour optimiser les signaux du  $\text{SF}_6$ . Avec une acquisition radiale 3D UTE, le système permettait de réduire TE jusqu'à environ 0,2 ms. Compte tenu de la relaxation longitudinale très rapide du  $\text{SF}_6$  à 1,5 T (estimée à moins de 10 ms), TR=7,2 ms et un angle élevé de  $45^\circ$  ont été utilisés. Les images présentées sur la Figure 3.23 ont été obtenues avec deux résolutions spatiales différentes avec une bande passante de 144 Hz/pixel. Une résolution isotrope de 2 mm permettait d'obtenir un RSB de 93 en 1 min d'acquisition ; une résolution isotrope de 1 mm avait une RSB de 48 en 4 min.

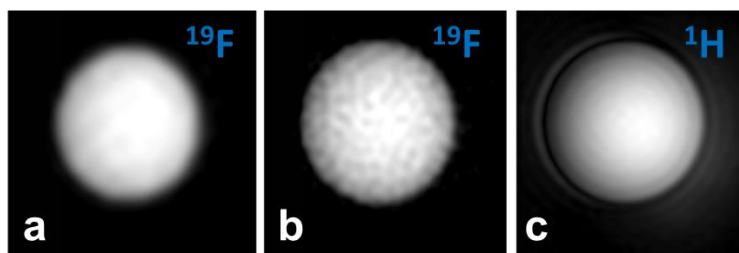


Figure 3.23. Résultats *in vitro* avec deux séries de paramètres d'acquisition : résolution de 2 mm (a) et de 1 mm (b) sur l'échantillon  $\text{SF}_6$  à polarisation thermique et résolution de 1 mm (c) sur l'échantillon de l'eau.

Pour l'imagerie *in vivo*, il est réaliste d'administrer des mélanges 70%  $\text{SF}_6$  et 30%  $\text{O}_2$  tout en conservant une anesthésie gazeuse. La fraction volumique du gaz dans les poumons (par rapport au volume total de gaz et de parenchyme) est de l'ordre 50%. On s'attend donc à une perte de sensibilité *in vivo* par réduction de la densité moyenne du gaz, mais des signaux toujours détectable avec l'antenne développée. Combiné avec le fait que l'imagerie UTE est peu sensible aux mouvements respiratoires, cette séquence est considérée potentiellement transférable *in vivo* chez le rat, ce que nous avons cherché à faire par la suite.

#### 3.2.5.2.5 Adaptation du système expérimental pour l'imagerie du fluor

Pendant l'expérience, les rats étaient anesthésiés par 1,5% d'isoflurane dans 1 L/min  $\text{O}_2$  délivré par le masque nasal (Figure 3.24a).



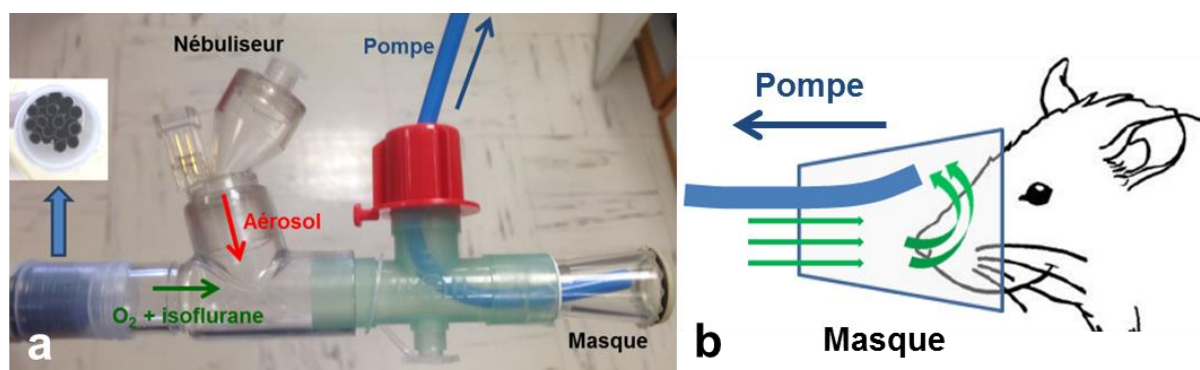


Figure 3.24. Système de nébulisation *in vivo* adapté à la nébulisation de l'aérosol à base de solution fluorée. (a) Le débit d'aérosol de PFCs généré par le nébuliseur à maille vibratoire délivrait un aérosol avec un débit équivalent de liquide à 0,64 mL/min (flèche rouge). Le rat était ventilé avec un débit d'entrée de 2 L/min O<sub>2</sub> et 1,5% d'isoflurane (flèche verte). L'isoflurane exhalé par l'animal était ensuite pompée avec un débit d'environ 1,5 L/min (flèche bleue). (b) La configuration locale dans le masque permettait une circulation de l'aérosol (flèches vertes) pour optimiser en théorie la quantité d'aérosol fluoré administrée au rat.

Le système de nébulisation a été adapté ici à l'administration de FC770, qui a des propriétés différentes de celles de l'eau ou du Gd-DOTA. Comme la densité de FC770 est environ deux fois plus grande que celle de l'eau, le débit dans la ligne d'anesthésie doit être bien contrôlé. L'aérosol sédimente plus facilement sur les parois si le débit est trop faible, et il tend à s'évaporer si le débit est trop élevé. Pour laminariser le flux d'entrée et réduire ainsi les turbulences induisant une vaporisation, un système de tubulure a été ajouté en entrée (Figure 3.24a). Au niveau du nez du rat, un tuyau d'aspiration a été ajouté pour récupérer le gaz anesthésiant et l'aérosol exhalés (Figure 3.24b). Puisque la distance de sédimentation de l'aérosol FC770 est en théorie d'une dizaine centimètre à cause de sa forte densité, l'aérosol se trouvait donc principalement dans la partie basale du masque. La configuration proposée permettrait de créer une circulation autour du nez de rat afin de tenter d'augmenter la quantité administrée au rat.

### 3.2.5.2.6 Résultats préliminaires d'imagerie *in vivo* chez le rat

Des expériences *in vivo* de faisabilité ont été ensuite effectuées afin de démontrer le fonctionnement effectif de l'antenne chez l'animal, et de l'appliquer à mesurer les dépôts d'aérosols de PFC et la ventilation au SF<sub>6</sub>.

L'image axiale de l'anatomie pulmonaire de rat a été obtenue par séquence 3D UTE en proton (détaillé dans le chapitre 3.2.4), démontrant une image de bonne qualité avec un signal du parenchyme pulmonaire de ~50% celui du muscle (Figure 3.25a). Le RSB de cette antenne double-résonance a été comparé à l'antenne proton standard (chapitre 3.2.5.1) de même taille (47 mm), présentant une légère perte de 30% (Figure 3.25).



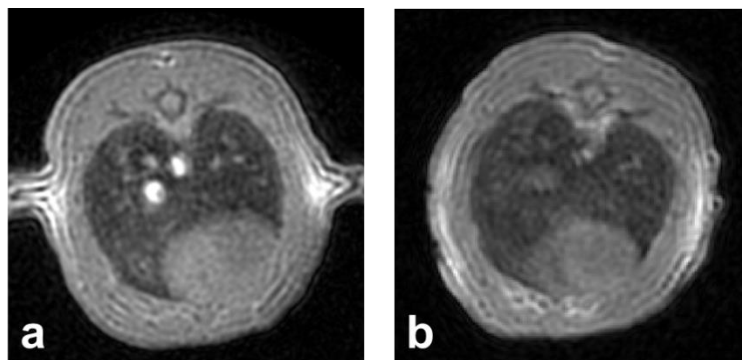


Figure 3.25. Image axiale en proton du poumon du rat par 3D UTE avec voxel isotrope de 0,5 mm acquise par l'antenne double résonance (a) et l'antenne proton standard (b). Les RSB du poumon sont respectivement 18 et 26.

Après des séries d'image de calibration (puissance transmise et localisation), l'aérosol de FC770 a été nébulisé en continu (environ 0,64 mL/min). La séquence en fluor ( $TE = 4,8$  ms, voxel =  $(1 \text{ mm})^3$ ) mise en place *in vitro* (détaillé dans 3.2.5.2.4) a été utilisée pour imager les dépôts accumulés au cours du temps. Toutefois, après 15 minutes d'administration d'aérosol par respiration spontanée dans le masque, nous n'avons pas pu détecter de dépôt de FC770 dans le poumon du rat (Figure 3.26b). Cette absence de signal provenant du dépôt pourrait être due à la concentration insuffisante des dépôts dans le poumon du rat, ou bien à l'évaporation rapide de FC770 sous forme de l'aérosol. Le seuil de détection peut être estimé approximativement à partir du RSB mesuré sur le cathéter en référence. Un RSB de l'ordre de 30 dans un voxel de  $1 \mu\text{L}$  suggère qu'une gouttelette de l'ordre de 100 nL soit la quantité minimale détectable avec les paramètres retenus, d'après le critère de Rose.

Afin d'augmenter la concentration des dépôts dans le poumon, un rat a été mis dans une chambre de nébulisation avec son nez placé à une ouverture de chambre et il respirait spontanément d'un mélange de 1 L/min d'oxygène, 1,5% d'isoflurane et l'aérosol de FC770 pendant deux heures. Ce protocole a été bien supporté par le rat, pourtant aucun signal n'a pu être mesuré.

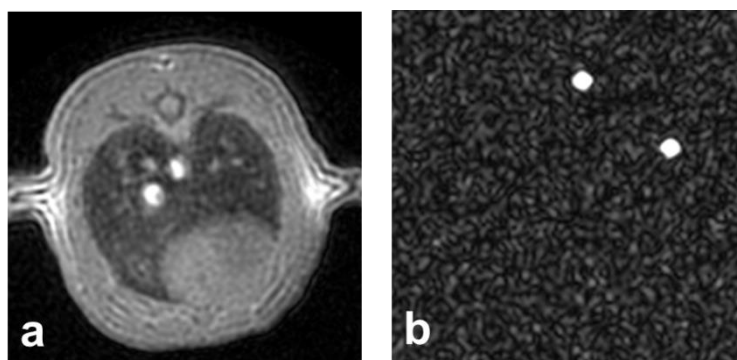


Figure 3.26. (a) Image axiale en proton du poumon du rat par 3D UTE avec voxel isotrope de 0,5 mm. (b) Image en fluor au même endroit avec un cathéter rempli de FC770 liquide sur la peau du rat en référence. Aucun signal n'est détectable dans les poumons, en revanche le signal provenant de cathéter était bien présent.

Ce résultat montre la difficulté de réaliser des dépôts de PFC liquide et de les mesurer par inhalation

spontanée par le nez. Pour augmenter la sensibilité, la résolution spatiale pourrait être dégradée et le temps d'écho réduit. La séquence UTE n'était pas applicable directement pour les PFC liquides à cause de leur décalages chimiques complexes produisant des artefacts difficilement interprétables. Cette limitation n'était pas applicable au SF<sub>6</sub> que nous avons ensuite testé *in vivo*. On notera que des expériences complémentaires ont été effectuées par la suite avec nébulisation d'aérosols fluorés, notamment en spectroscopie, qui a démontré la possibilité de détecter la présence de PFC liquides *in vivo*, mais pas dans les poumons. Ces résultats complémentaires sont présentés en annexe.

### 3.2.5.2.7 Faisabilité de l'imagerie *in vivo* de gaz fluoré à polarisation thermique à 1,5T

La faisabilité de l'imagerie de ventilation avec gaz hexafluorure de soufre (SF<sub>6</sub>) a été testée *in vivo*. Le gaz SF<sub>6</sub> a une densité de 6,27 kg/m<sup>3</sup> et une viscosité dynamique de 14,2 µPa·s (247 - Wild 2009). Par rapport à l'air, la viscosité augmente et la diffusivité d'oxygène dans les acini diminue pour le mélange SF<sub>6</sub>-O<sub>2</sub> (248 - Weibel 2005). Une image en proton a été réalisée avant la ventilation de SF<sub>6</sub>, avec un RSB à l'ordre de 60 (Figure 3.27a). Un régulateur de débit [Débit massique Coriolis, Brooks Instrument, USA] a été utilisé pour mélanger le SF<sub>6</sub> et l'O<sub>2</sub> d'une manière contrôlable à l'aide d'une interface développée sous Matlab. La fraction volumique de SF<sub>6</sub> variait de 70% à 92% de courte durée pour les essais préliminaires. Un cathéter de référence rempli de gaz SF<sub>6</sub> a été également placé sur l'animal. En augmentant progressivement les pourcentages SF<sub>6</sub> dans le mélange SF<sub>6</sub>/O<sub>2</sub>, des séries de spectres ont été lancées pour suivre l'accumulation de gaz fluoré au cours du temps pour chaque mélange, afin d'optimiser le débit de SF<sub>6</sub>. Une fois que le signal du pic du SF<sub>6</sub> était stable dans le temps indiquant un équilibre dans les poumons, une séquence 3D UTE était appliquée pour localiser le gaz dans le poumon. Cette séquence était implémentée avec les paramètres suivants : TR/TE = 7,5/0,2 ms, résolution isotrope de 2 mm, NSA (nombre de signal moyenné) = 16, BW = 170 Hz/pixel et  $\alpha = 30^\circ$  et une acquisition totale de 10 min 49 s.

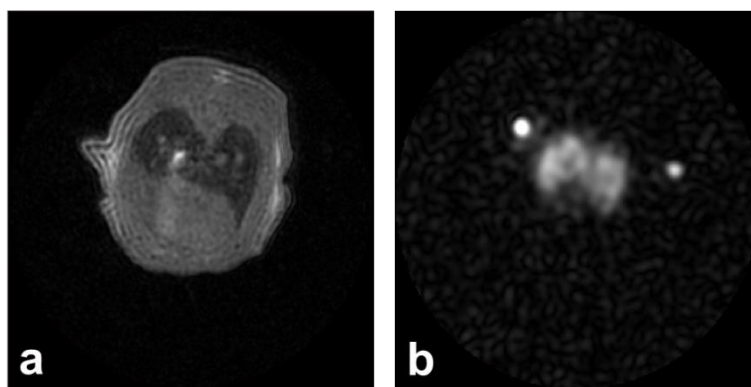


Figure 3.27. Résultats préliminaires de l'imagerie de ventilation du gaz SF<sub>6</sub>. L'image axiale en proton montrant le poumon de rat par 3D UTE (voxel isotrope de 0,5mm) avec un RSB de 62 (a). L'image en fluor à la même position (2 mm de résolution spatiale), 3 minutes après la respiration spontanée de 90% SF<sub>6</sub> et 10% O<sub>2</sub> (1,75 L/min), présentait un RSB de 44 sur le cathéter gauche et à 20 dans les poumons (b).

Un RSB plus élevé a été obtenu avec le mélange non-physiologique de 10% O<sub>2</sub> et 90% SF<sub>6</sub> (débit moyenne de 1,75 L/min). Dans les poumons ventilés de SF<sub>6</sub>, le RSB atteignait jusqu'à 20 ; tandis que

le RSB mesuré sur le cathéter de référence était environ 2 fois plus élevé de 40 (Figure 3.27b). L'image correspond donc à la ventilation au SF<sub>6</sub>. Le protocole a été bien supporté pour des fractions volumiques d'oxygène > 20%. Ces éléments préliminaires d'imagerie fournissent une base pour définir des protocoles de ventilation au SF<sub>6</sub> permettant d'obtenir un signal mesurable dans les poumons.

### 3.2.5.2.8 Discussion et Conclusion

L'étude sur l'antenne double-résonance fluor/proton consistait à tester la faisabilité de la détection du dépôt d'aérosol et des gaz à base de molécules fluorées dans le poumon du rat *in vivo*.

Le protocole de l'administration d'aérosol fluoré par inhalation spontanée du nez n'a pas permis d'obtenir une sensibilité suffisante pour détecter le signal provenant de dépôt dans le poumon de rat. Cela peut être dû à plusieurs possibilités. Premièrement, une perte importante dans la région extrathoracique environ 50% (173 - Leong 1998) à cause de la géométrie des voies aériennes du rat pourrait éventuellement limiter la dose administrée dans le poumon : le nez cilié et la gorge petite et courbée sont des filtrages naturels. Les particules supérieures à 5 µm (ici FC770 entre 4,5 µm et 7,8 µm) se déposent principalement dans la région extrathoracique et peu dans les alvéoles (Figure 2.10). Pour aérosoliser les liquides PFC, un cathéter spécifique avec deux tuyaux fins contenant séparément du gaz et du liquide PFC, combiné avec un jet d'aérosol (pneumatique) peut être utilisé à produire les particules (249 - Murgia 2011). Avec un tel dispositif, la fraction des dépôts peut être augmentée jusqu'à 60% avec des particules larges (MMAD de ~10 µm) dans les trois premiers générations d'un modèle néonatal *in vitro* (250 - Goikoetxea 2014). Le protocole de 2 – 4 heures de ventilation mécanique, combinée avec la nébulisation intratrachéale d'une dose 10 mL/kg/h de l'agent fluoré sont généralement utilisés pour améliorer effectivement l'échange du gaz et les mécanismes pulmonaires (251 - von der Hardt 2002, 252 - Murgia 2012). L'évaporation rapide des PFC peut être une autre cause importante expliquant l'absence du signal *in vivo* après nébulisation. La tension de surface de la plupart de produits PFCs est environ 5 fois plus petite, ici 14,8 dynes/cm pour FC770 et 72 dynes/cm pour l'eau. Comme ce paramètre est inversement proportionnel à la vitesse de vaporisation (253 - Garai 2009), il est possible que la plupart de l'aérosol administré dans le poumon de rat se soit vaporisée pendant la respiration.

Dans cette expérience, 2 h d'administration d'aérosol par inhalation spontanée n'a pas permis d'obtenir de signal détectable par IRM, ce qui a été constaté également par Thomas et al (254 - Thomas 1997) pendant 2 – 4 h d'un protocole similaire. Cependant leur protocole de l'administration de 4 h avec la trachéotomie permet de quantifier les dépôts totaux dans les poumons. Un seuil de détection de 500 µg par poumon a été estimé. En considérant une quantité mesurée de tissu pulmonaire ~ 2,5 g (densité environ 0,5 g/mL) et un voxel d'environ 1 mm<sup>3</sup>, une limite de détection en moyen de 0,15 g/L en 52 min à 0,14 T est nécessaire. D'après notre mesure de signal provenant du cathéter de FC770, une gouttelette de l'ordre de 100 nL soit la quantité minimale détectable. Avec 1 mm<sup>3</sup> de voxel utilisé ici, une limite de détection de 0,18 g/L en 1 min à 1,5 T est considérée, qui est comparable à celle de Thomas *et al*. Le seuil de sensibilité estimé est donc de l'ordre de 0,5 M en ~1 min, ce qui

nécessite une accumulation importante de particules fluorés dans les voies aériennes pour être détectable.

L'approche d'imagerie du fluor à l'état gazeux ( $\text{SF}_6$ ) a été mise en place *in vitro* et ensuite testé *in vivo* pour explorer le poumon. Les premiers essais ont donnés des résultats plutôt positifs montrant l'état de ventilation homogène dans un poumon sain et fournissant une base pour optimiser les paramètres d'acquisition à l'avenir.

Parmi les différents produits, PFOC est une solution prometteuse avec une meilleure tolérance et une élimination rapide (255 - Chenoune 2014). Par la suite, le PFOC a été retenu pour tester la faisabilité de l'administration chez le rat *in vivo*. Des résultats préliminaires sont présentés en annexe.

## Chapitre 4.

# Mise en place de l'imagerie des dépôts d'aérosol de Gd-DOTA sur rats sains

---

Dans ce chapitre sont présentés la mise en place du protocole d'imagerie UTE *in vivo* et les résultats correspondants. Le protocole expérimental d'administration et d'imagerie de l'aérosol chez le rat sera d'abord décrit. Ensuite les traitements spécifiques des données d'imagerie développés pour traiter quantitativement les jeux de données seront introduits. Enfin, les résultats sur le dépôt d'aérosol total, régional, la clairance et les paramètres RMN associés seront présentés et discutés.

---

### 4.1 Protocole expérimental

#### 4.1.1 Modèle de rats sains

Pour l'étude de la faisabilité du protocole d'imagerie, des rats ( $n = 6$ , mâle Wistar, âgé de 6/7 semaines, 180-200 g) [JANVIER LABS, Saint Berthevin, France] ont été utilisés. Les expériences ont été réalisées en suivant les directives du comité d'éthique d'établissement local concernant l'expérimentation animale. Le protocole expérimental était initialisé à la suite d'une adaptation des animaux durant 1 semaine à température ambiante régulée et avec un cycle alterné de 12 heures de jour/nuit.

#### 4.1.2 Protocole d'administration

Les rats avaient une phase d'induction d'anesthésie avec 4% isoflurane dans 0,8 L/min d'oxygène ( $O_2$ ) pur dans une chambre d'induction. Ils étaient ensuite gardés anesthésiés durant toute l'expérience avec 2% d'isoflurane dans 0,8 L/min d' $O_2$  pur délivré au travers du masque nasal. Un nébuliseur à maille vibratoire [Aeroneb<sup>®</sup> Solo; Aerogen, Galway, Ireland] a été inséré dans la ligne d'entrée du gaz anesthésiant juste avant le cône du nez à l'intérieur de l'IRM. Après l'acquisition d'images de localisation, du gadoterate meglumine (Gd-DOTA) [Dotarem<sup>®</sup>; Guerbet, Villepinte, France] à la concentration de 0,5 mol/L a été aérosolisé en continu et délivré au rat pendant ~14 minutes.

#### 4.1.3 Protocole IRM

Les mesures par IRM ont été mises en place sur un système clinique 1,5 T [Achieva; Philips Healthcare, Best, The Netherlands]. L'animal était positionné perpendiculairement au champ magnétique statique. Le rat était inséré à travers l'antenne circulaire de réception de diamètre interne

de 47 mm (antenne microscopique standard de Philips). La région thoracique du rat, entourée par l'antenne, était placée exactement au centre du système IRM. Les impulsions radiofréquence étaient appliquées *via* l'antenne de corps entier intégrée. Après une localisation initiale des poumons de rat, deux acquisitions radiales 3D étaient effectuées avec différents temps d'écho permettant de cartographier  $R_2^*$ ,  $TE_1/TE_2 = 0,4/1,4$  ms, et un temps de répétition de  $TR = 14,7$  ms pour la caractérisation du parenchyme pulmonaire de l'animal. Ensuite, la séquence radiale 3D UTE isotrope pondérée en  $T_1$  était répétée une fois pré-administration, pendant l'administration, et jusqu'à 1 heure post-administration (Figure 4.1b). Les détails de cette séquence UTE se trouvent dans le chapitre 3.2.4.

A la fin du protocole (1 h post-administration),  $R_2^*$  a été cartographié une nouvelle fois pour caractériser des éventuels changements post-contraste. Enfin, une séquence dite « ciné » synchronisée sur la respiration d'animal a été appliquée ( $TR/TE = 5,2/2,6$  ms,  $T_{acq} = 5,6$  min,  $\alpha = 60^\circ$ ,  $BW = 854$  Hz, phases = 50, voxel = 1 mm) pour estimer le volume courant.

Le protocole d'expérimentation animale ne prévoyait pas d'effectuer de suivi longitudinal, les rats ont donc été euthanasiés à la fin de protocole d'imagerie à l'aide d'une overdose d'isoflurane (5%) suivi d'une injection intracardiaque de penthiobarbital.

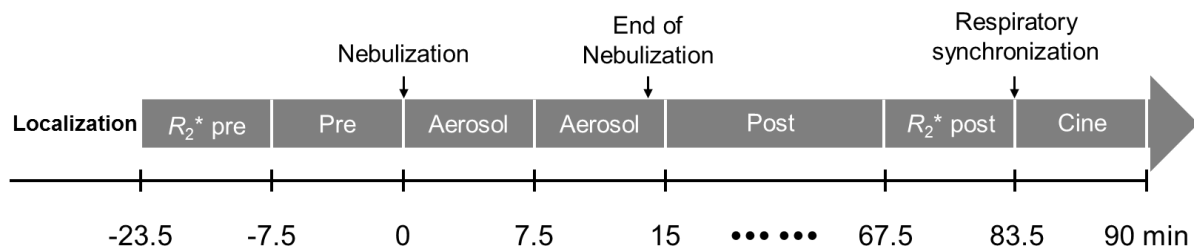


Figure 4.1. Chronologie du protocole d'acquisition. Le protocole commence avec une localisation et une séquence radiale 3D répétée avec 2 TEs pour cartographier  $R_2^*$ . La séquence radiale 3D UTE isotrope pondérée en  $T_1$  était ensuite effectuée pré-contrast ( $t = 0$  min), pendant la nébulisation d'aérosol (jusqu'à  $t = 14$  min), et était répétée jusqu'à 1 heure post-administration. A la fin,  $R_2^*$  post-contraste était cartographié et le volume courant était estimé en utilisant une séquence ciné synchronisée sur la respiration de l'animal.

## 4.2 Analyse des images

Nous présentons dans cette partie les analyses d'image et les traitements des données développés pour extraire des paramètres synthétiques des acquisitions. Les données ont été traitées hors-ligne à l'aide de Matlab [2012a version; The Mathworks, Natick, MA].

### 4.2.1 Segmentation du poumon

Le principe de la segmentation du poumon développée était basé sur une classification des voxels

basée sur la valeur du signal sur l'acquisition de référence pré-contraste, séparant les voxels correspondant au parenchyme (valeurs de signal plus faibles) des voxels correspondant aux vaisseaux et aux tissus environnant (valeurs de signal plus élevées).

#### 4.2.1.1 *Méthode basique*

Dans un premier temps, les poumons étaient segmentés semi-automatiquement à partir de la comparaison des jeux de données pré-administration avec les TE court et long (le parenchyme possédant un  $T_2^*$  très court). Après un seuillage réadapté *a posteriori* sur chaque jeu de données, des opérations d'érosion-dilatation et de connectivité, une région d'intérêt (ROI) préliminaire de parenchyme pulmonaire était définie. Sur l'image de référence 3D UTE, l'histogramme dans cette ROI préliminaire était ajusté à une distribution gaussienne à deux composantes (notation utilisée pour la première composante : moyenne  $m$  et écart-type  $\sigma$  (SD)) par la méthode de Nelder-Mead (234 - Lagarias 1998). Un masque plus raffiné était obtenu pour le parenchyme pulmonaire par le seuillage de l'image de référence à  $m+2\sigma$  classifiant l'intensité plus faible comme étant du parenchyme pulmonaire et plus élevée comme étant des composantes vasculaires (Figure 4.2).

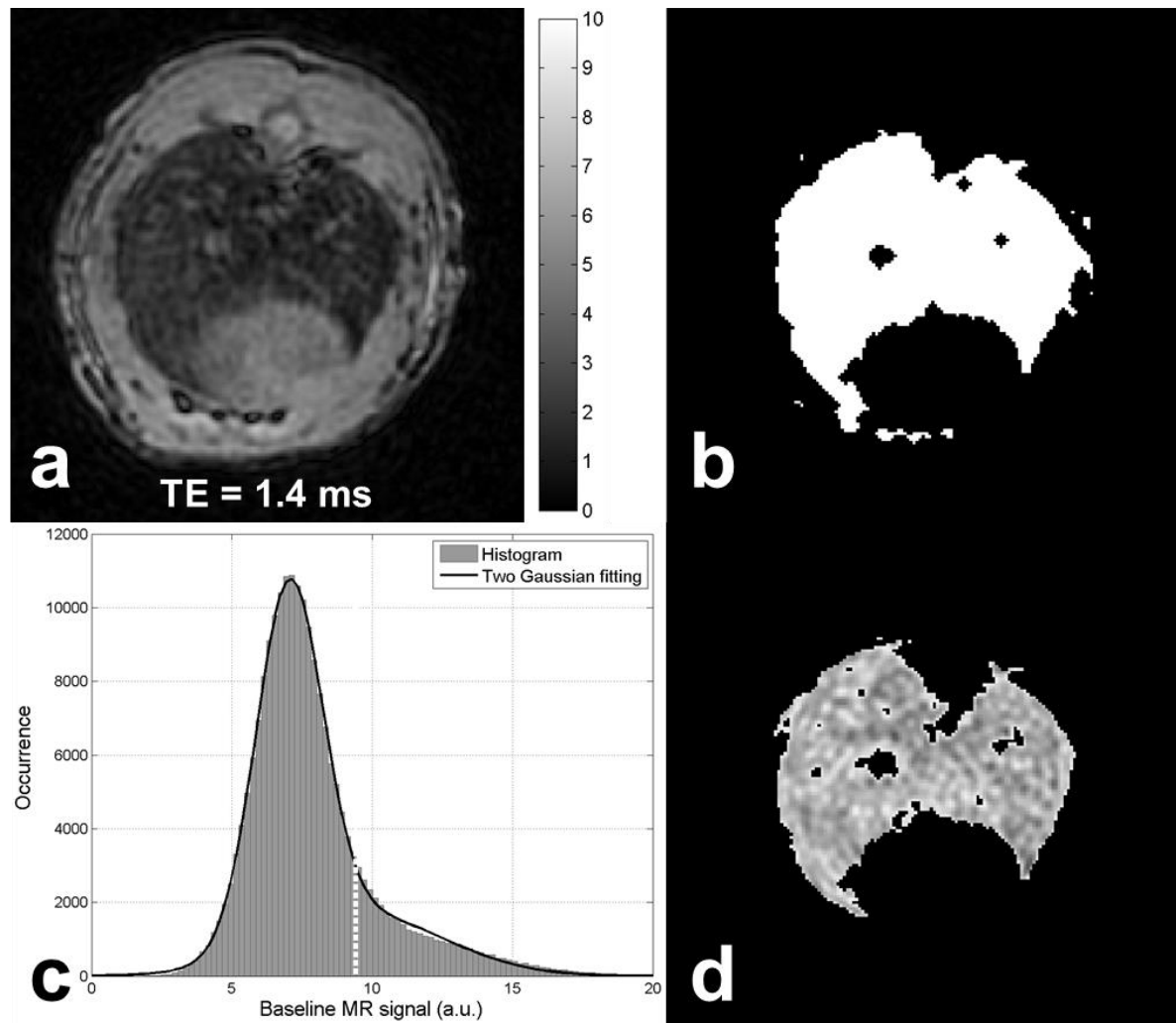


Figure 4.2. Segmentation du parenchyme pulmonaire. La segmentation préliminaire (b) était basée sur les acquisitions  $R_2^*$ -pré-contraste (a) avant le seuillage à partir de l'histogramme sur la 3D UTE de référence, histogramme ajusté par une distribution gaussienne à deux composantes (c). Le seuillage ( $m+2\sigma$ , ligne pointillée blanche) correspondant à la première composante permettait une discrimination entre parenchyme pulmonaire (d) et le système vasculaire et les muscles. Cet algorithme semi-automatique donne visuellement une segmentation 3D satisfaisante qui extrait le parenchyme tout en excluant une partie des gros vaisseaux.

#### 4.2.1.2 Méthode avancée

Pour rendre la segmentation plus robuste et plus objective, une méthode plus avancée a été développée. Le développement de cette méthode sera plus détaillé dans le chapitre 5.2.1.2. Puisque la sensibilité de réception variait de  $\sim 50\%$  sur le volume des poumons, l'histogramme de signal était corrigé par une carte de sensibilité de réception. Cette carte de sensibilité était extrapolée par un lissage sur le champ de vue entier des jeux de données à TE long (dans lesquels le signal provenant de parenchyme avait une pondération  $T_2^*$  extrêmement forte), dès que les tissus environnant avaient été segmentés par un seuillage à un niveau *a posteriori*. Un masque préliminaire relativement brut de la région pulmonaire était également disponible au cours de ce processus de seuillage initial (Figure 4.3a').



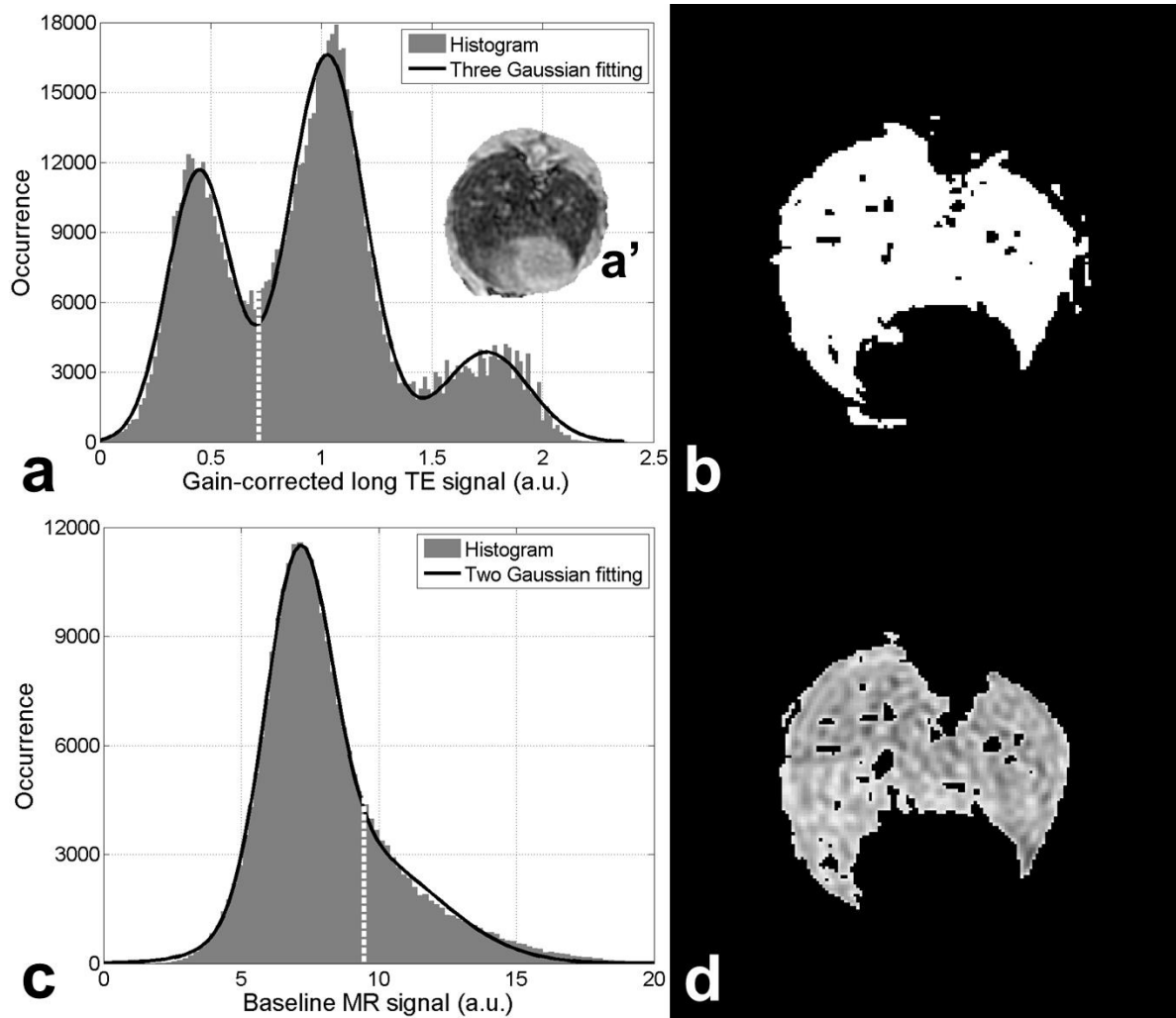


Figure 4.3. Segmentation du parenchyme pulmonaire. A partir de l'histogramme de l'image avec un TE long après une correction du gain de réception sur le masque brut (a'), celui-ci était ajusté à une distribution Gaussienne à trois composantes (a). Une segmentation préliminaire (b) était obtenue pour des intensités de signal plus faible que  $m_1+2\sigma_1$  (ligne pointillée blanche dans (a)). L'histogramme de l'image de référence était ensuite ajusté avec une distribution Gaussienne à deux composantes. Le seuillage ( $m_1+2\sigma_1$ , ligne pointillée blanche dans (c)) permettait d'une discrimination entre la ROI finale de parenchyme pulmonaire (d) et le système vasculaire et les muscles.

L'histogramme de TE long après la correction de gain était ajusté sur le masque brut à une distribution Gaussienne à plusieurs composantes ( $n > 2$ ) en utilisant un algorithme Expectation-Maximization (256 - Dempster 1977) (moyennes notées  $m_i$  and écart-types  $\sigma_i$  (SD),  $i = 1, 2, 3$ , respectivement, pour première, deuxième, et troisième composante, triées par valeurs croissantes) (Figure 4.3a). Une ROI préliminaire du parenchyme pulmonaire correspondait aux intensités de signal plus faibles que  $m_1+2\sigma_1$  (Figure 4.3b). L'histogramme sur la 3D UTE de référence dans cette ROI préliminaire était ensuite ajusté à une distribution Gaussienne avec deux composantes en utilisant la méthode de Nelder-Mead (234 - Lagarias 1998) (Figure 4.3c). Après quelques opérations de connectivité, un masque raffiné était obtenu pour les poumons par un seuillage de l'image de référence à  $m_1+2\sigma_1$ , classifiant les voxels d'intensité plus élevés comme le système vasculaire et plus faible comme parenchyme pulmonaire.

Une correction manuelle plus fine sur la projection des coupes en axial permettait d'exclure certaines régions mal classées de la colonne vertébrale, et une ROI pulmonaire finale était obtenue (Figure 4.3d). Ce masque extrait fournissait une estimation de volume pulmonaire qui sera ensuite utilisé au cours des analyses.

#### 4.2.2 Analyse des données

Le rehaussement relatif du signal (RSE) dans la ROI pulmonaire a été calculé pour les acquisitions UTE pondérée- $T_1$ . Ce RSE a été analysé et converti en carte de concentration en utilisant l'approche décrite dans le chapitre 3.1.2. Le temps de relaxation longitudinale pré-contraste  $T_{1,0}$  pour les poumons de rat à 1,5 T a été mesuré pour un rat par la méthode de l'angle de basculement variable (20 - Fram 1987). Nous avons considéré également une relaxivité molaire  $r_1 = 3,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  pour Gd-DOTA (29 - Rohrer 2005) afin de compléter la conversion de RSE en concentration.

Le taux d'élimination a été estimé comme la pente de décroissance du RSE après l'administration (RSE étant exprimé en % de rehaussement, le taux d'élimination sera donné par % de décroissance de signal par heure). Un temps caractéristique d'élimination a été calculé comme le rapport du rehaussement maximal au taux d'élimination. Pour évaluer la concentration de Gd-DOTA dans la circulation sanguine, RSE a été analysé également dans la région englobant le cœur et les vaisseaux pulmonaire segmentés par une méthode semi-automatique similaire à la génération de la ROI des poumons.

#### 4.2.3 Effet de $R_2^*$ sur la quantification

A partir des acquisitions aux deux TE, des cartes de  $R_2^*$  ont été calculées. La moyenne de  $R_2^*$  et son erreur type de la moyenne ont été évalués sur la ROI du parenchyme pulmonaire comme décrit dans le chapitre 3.1.3. Afin d'estimer l'effet de  $R_2^*$  sur la quantification de dépôt via  $R_1$ , deux modèles de signal basé sur les équations (3.12) et (3.13) ont été comparés : (i) en prenant en compte de changement de  $R_2^*$  avec l'utilisation de mesure de  $R_2^*$  pré- et post-contraste  $E_{2,C} = E_2/E_{2,0}$ , et (ii) en considérant les changements de  $R_2^*$  avec la concentration comme négligeable ( $E_{2,C} = 1$ ). La valeur  $R_1$  et la concentration estimée dans les deux cas seront notés  $R_{1,\text{est1}}$ ,  $R_{1,\text{est2}}$  et  $C_{\text{est1}}$ ,  $C_{\text{est2}}$ , respectivement.

#### 4.2.4 Evaluation de la dose administrée

Le réservoir du nébuliseur, destiné à l'usage chez l'adulte, contenait 7 mL de Gd-DOTA, cependant seulement une petite fraction d'aérosols passait à travers la ligne d'entrée du gaz anesthésiant. Pour estimer la concentration d'aérosol dans cette ligne, des expériences sur fantômes ont été effectuées ( $n = 5$ ) dans lesquels la ligne d'entrée était immergée dans un tube rempli d'eau pour piéger les aérosols s'écoulant à travers la ligne. La concentration de Gd-DOTA dans le tube était ensuite mesurée via la cartographie  $T_2^*$  après calibration initiale de la relaxivité molaire  $r_2^*$  pour Gd-DOTA dans l'eau à 293 K égale à  $5,96 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  comme présenté dans le chapitre 3.1. Pour estimer la limite supérieure de la dose administrée, le volume courant a été mesuré chez 3 rats par la séquence ciné synchronisée au

cycle respiratoire de l'animal et effectuée à la fin de l'étude dynamique. Les segmentations étaient réalisées manuellement sur chaque coupe des jeux de données cinétique pour des volumes minimaux (correspondant à l'expiration) et maximaux (correspondant à l'inspiration), qui étaient sélectionnés visuellement sur le cycle respiratoire. Le changement de volume, donc le volume courant, a été estimé comme la différence entre les volumes minimaux et maximaux.

En fin de compte, la limite supérieure de la quantité d'aérosol administré a pu être estimée comme le produit de volume courant, par la durée d'administration, la fréquence respiratoire pendant l'administration ( $38 \pm 4$  cycles par min), et la concentration d'aérosol Gd-DOTA dans la ligne d'entrée.

#### 4.2.5 Distribution des dépôts d'aérosol

Comme décrit dans le chapitre 2.1.2, les poumons de rat se séparent en 5 lobes au total. La morphologie complexe des voies aériennes rend le traitement des données et la quantification de la distribution d'aérosol déposé dans chaque lobe difficile. Afin d'étudier la dépendance régionale du dépôt d'aérosol, les poumons ont été divisés en volumes identiques le long de trois directions anatomiques, et le long de régions centrale/périphérique séparées par une sphère ayant son centre localisé au point de intersection déterminé par les 3 directions précédentes (apex et base du poumon n'incluaient que les tissus périphériques) (Figure 4.4). La quantité d'aérosol déposée a été calculée pour chaque région segmentée en fonction de la séparation gauche/droit, antérieur/postérieur, tête/pied et centrale/périphérique.

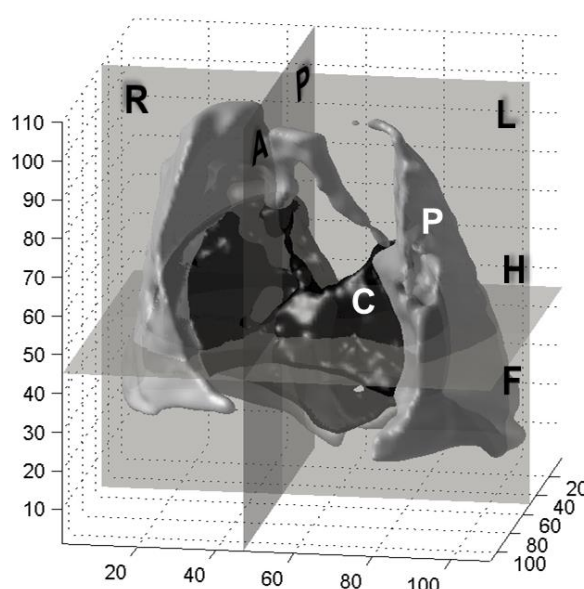


Figure 4.4. Le poumon segmenté était divisé en volumes égaux le long de 4 directions anatomiques, gauche/droite (L/R), antérieur/postérieur (A/P), tête/pied (H/F) et centrale/périphérique (C/P) pour l'analyse régionale.

#### 4.2.6 Analyse statistique

Toutes les données descriptives ont été exprimées comme la moyenne arithmétique  $\pm$  erreur type de la moyenne (SEM), sauf si mentionné différemment. Une analyse statistique a ensuite été effectuée en utilisant le test d'égalité des espérances (Student's *t*-test) pour deux observations appariées ou non-appariées. Les différences étaient considérées significatives pour  $p < 0,05$ .

### 4.3 Résultats

Tous les rats ont survécu à l'administration et ont pu être suivi jusqu'à la fin du protocole d'imagerie. Leur fréquence respiratoire ne variait pas significativement pendant l'administration de l'aérosol, indiquant une bonne tolérance de la procédure de nébulisation.

#### 4.3.1 Analyse quantitative in vivo

Nous avons obtenu  $T_{1,0} = 1105 \pm 8,6$  ms sur le parenchyme pulmonaire en accord avec de précédentes mesures similaires (257 - Shioya 1990), et  $T_{1,0} = 1,1$  s a été utilisé pour la quantification de concentration par la suite. Le signal était rehaussé d'une manière significative et homogène dans les poumons après l'administration d'aérosol de Gd-DOTA ( $10,51 \pm 0,42$ , a.u.) comparé au signal de référence ( $7,13 \pm 0,42$ , a.u.,  $p < 0,001$ ) (Figure 4.5 a&b).

La concentration moyenne d'aérosol dans les poumons, estimée à partir des cartes de concentration mesurée à la fin de l'administration lorsque le rehaussement est maximal, était de  $0,15 \pm 0,02$  mM. En considérant une fraction volumique effective du parenchyme pulmonaire de l'ordre de  $\sim 0,5$  (densité proche de  $0,5 \text{ g/cm}^3$  (35 - El-Khatib 1989)), la quantité totale du dépôt d'aérosol dans les poumons peut être estimée à  $0,21 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol}$  (Figure 4.5c), ou  $1,05 \pm 0,15 \text{ } \mu\text{mol/kg BW}$  (dosage basé sur le poids corporel). En considérant l'équation (3.15) avec les paramètres mesurés  $\text{RSB} = 28$ ,  $\alpha = 30^\circ$ ,  $T_{1,0} = 1100$  ms et  $r_1 = 3,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , la précision moyenne sur la cartographie de concentration peut être estimé comme étant de l'ordre de  $20 \text{ } \mu\text{M}$ . Cette précision donne une estimation de la limite de détection.

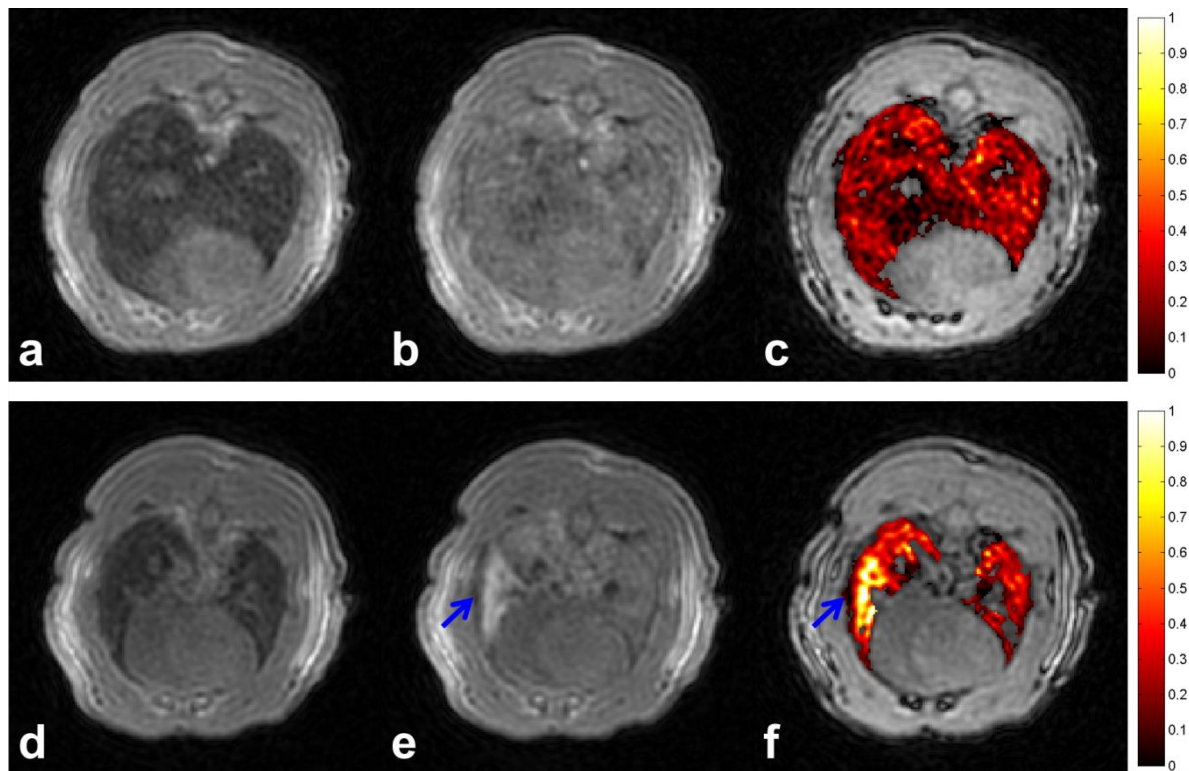


Figure 4.5. Coupes axiales représentatives obtenues avec la séquence 3D UTE isotrope ( $TR/TE = 14/0,4$  ms,  $FOV = 64$  mm,  $\alpha = 30^\circ$ ) pour pré- (a, d) et post- (b, e) administration d'aérosol, et les cartes de concentration associées (c, f, en mmol/L). Un rehaussement de signal homogène typique est présentée dans une région représentative (a, b, c). Des dépôts localisés avec un rehaussement de signal plus important dans la région apicale (flèches bleues ; d, e, f) ont été observés chez certains animaux. La concentration d'aérosol (en couleur) dans le poumon a été superposée sur l'image anatomique (en niveaux de gris,  $TR/TE = 14,7/1,4$  ms) pour simplifier l'interprétation (c, f). Le RSB pré-contraste pour le parenchyme pulmonaire était de 26, tandis que le RSB post-contraste dans la région rehaussée uniformément était de 46, et atteignait jusqu'à 82 dans les régions les plus rehaussées.

Les courbes montrant l'évolution de RSE pulmonaire dans le temps (Figure 4.6) montraient des tendances similaires pour tous les rats : une croissance rapide pendant l'administration (30% en moyenne pour les premières 7,5 min d'administration, 45% pour le reste des 6,5 min d'administration) jusqu'au rehaussement maximal comparable de  $(50 \pm 5) \%$ ; suivi par une décroissance progressive qui était bien modélisée par un taux d'élimination de 14% par heure, conduisant à un temps d'élimination caractéristique des poumons de 3,6 heures. A la fin de l'étude dynamique, le RSE moyen était toujours assez élevé  $(40 \pm 6) \%$ , quand la cartographie  $R_2^*$  était réalisée. On notera que les dynamiques du RSE montraient de la variabilité individuelle à la fois sur le rehaussement maximal et sur la cinétique d'élimination. Cette variabilité peut provenir du profil respiratoire spécifique, de la géométrie de voies aériennes et de variations physiologiques. Certaines zones localisées ont été observées chez 4 animaux, dans les régions sous-lobaires apicales ou intermédiaires (Figure 4.5 d-f). Ils montraient des RSE jusqu'à  $(78 \pm 43) \%$ , significativement plus élevé que les valeurs normales dans les autres régions. Le volume pulmonaire total (parenchyme et voies aériennes) a été estimé dans le groupe de rats sains ( $n = 6$ ) comme  $2,72 \pm 0,12$  mL, qui montrait une faible variabilité parmi les individus.

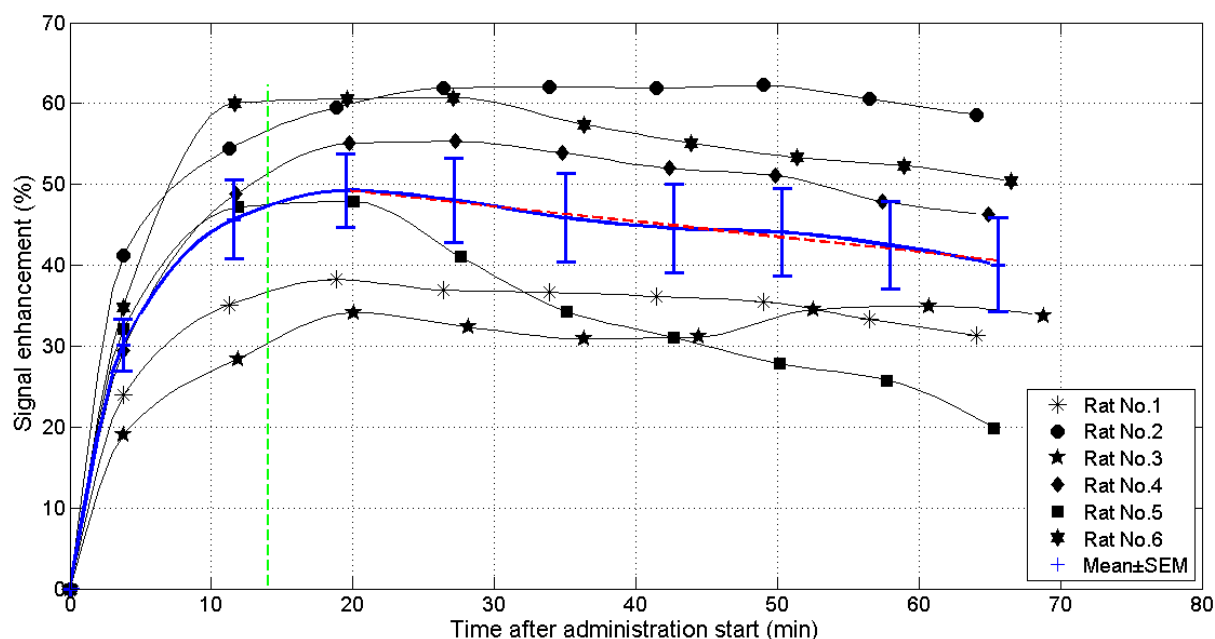


Figure 4.6. Les rehaussements de signal relatif pulmonaire (RSE) en fonction de temps. L'acquisition pré-contraste est utilisée comme référence ( $t = 0$  min). La fin de la nébulisation ( $t = 14$  min) est indiquée par la ligne pointillée verticale verte. Le rehaussement moyen sur ces six rats est donné par (moyenne  $\pm$  SEM) par la courbe plus épaisse bleue avec les barres d'erreur. Les courbes RSE montraient des tendances similaires : une augmentation pendant l'administration jusqu'au rehaussement maximal comparable suivi par une décroissance progressive, bien modélisée par une droite pendant la durée d'observation jusqu'à 1 heure (ligne pointillée en rouge). Le taux d'élimination était estimé par la pente de cette droite obtenue par ajustement au sens des moindres carrés sur les données après la fin de l'administration.

#### 4.3.2 Evaluation in vitro de la taille aérodynamique et de la dose administrée

Comme les résultats montrés dans le chapitre 3.2.1.4, les aérosols de Gd-DOTA étaient administrés au rat avec un MMAD de  $2,46 \pm 0,20 \mu\text{m}$  (moyen  $\pm$  écart-type;  $n = 12$ ) et GSD de  $1,54 \pm 0,02$  (moyen  $\pm$  écart-type;  $n = 12$ ).

Le volume courant mesuré était  $TV = 1,62 \pm 0,1 \text{ mL}$ , et la concentration Gd-DOTA estimée dans la ligne d'entrée de gaz était  $CL = 36 \pm 5,8 \mu\text{mol/L}$  de  $\text{O}_2$ . En considérant la durée d'administration moyenne de  $T = 14 \text{ min}$  et la fréquence respiratoire moyenne de  $R = 38$  cycles par minute, la limite supérieure de la quantité d'aérosol délivrée au rat a été estimée par  $(TV \times CL \times T \times R)$   $31 \pm 6,3 \mu\text{mol}$ , ou  $160 \pm 30 \mu\text{mol/kg BW}$ , présentant une fraction de  $\sim 1\%$  comparée à la quantité de solution initiale de Gd-DOTA. Cette valeur représente la dose maximum qui a pu entrer dans le poumon, sans considérer la sortie potentielle par expiration, la dilution du gaz dans le masque, ou la respiration partielle par la bouche.

#### 4.3.3 Mesure de $R_2^*$ et effet de $R_2^*$ sur la quantification

Les valeurs  $R_2^*$  ont eu tendance à diminuer après administration de Gd-DOTA, cependant d'une

manière non significative. Entre pré- et 1 h post-administration,  $R_2^*$  est passé de  $597,96 \pm 14,67 \text{ s}^{-1}$  à  $562,99 \pm 20,27 \text{ s}^{-1}$  ( $T_2^*$  augmente en moyenne de 1,67 ms à 1,78 ms). Ces mesures offrent une estimation pour  $E_{2,C} \approx 1,014$  à 1 h post-administration, montrant bien une tendance à un rehaussement du signal par effet de compensation de susceptibilité. Avec le TE court échantillonné ici lors de la quantification, la contribution de la relaxation transversale au rehaussement était donc limitée. Avec un RSE moyen de 40% à 1 h post-administration ( $S(C)/S_0 = 1,4$ ), les deux estimations proposées de  $R_1$  conduisent respectivement à,  $R_{1,\text{est1}} = 1,2991 \text{ s}^{-1}$  et  $R_{1,\text{est2}} = 1,3198 \text{ s}^{-1}$ . Par conséquent, négliger les variations de  $R_2^*$  avait des effets limités sur les estimations de  $R_1$ , avec une surestimation de 1,6% si les effets sont négligés. Néanmoins, cette supposition a un effet plus important sur l'estimation de concentration, en effet  $C_{\text{est1}} = 0,1054 \text{ mM}$  et  $C_{\text{est2}} = 0,1110 \text{ mM}$ . La concentration était donc surestimée d'environ  $\sim 5\%$  si  $R_2^*$  est considéré comme stable, par rapport à la concentration obtenue si on considère une décroissance exponentielle et la linéarité de la relaxation transversale apparente avec la concentration. En considérant  $C_{\text{est1}}$ , la relaxivité transversale apparente molaire  $r_2^*$  peut être estimé comme étant de l'ordre de  $-332 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , une valeur négative suggérant des effets de compensation de susceptibilité comme il sera discutée un peu plus loin. Avec cette estimation, l'extrapolation au rehaussement maximal ( $C = 0,15 \text{ mM}$ ) donne  $E_{2,C} = \exp(-TE Cr_2^*) \approx 1,0201$ , qui reste dans le même ordre de grandeur que à 1 h post-administration. Par conséquent, une petite déviation sur la concentration est obtenue entre les modèles ( $\sim 5\%$ ), indiquant que, dans la gamme de concentration faible et avec le TE court utilisé ici, les variations  $R_2^*$  peut être négligées. Cela confirme le rehaussement de contraste  $T_1$  prédominant dans le parenchyme pulmonaire en utilisant la séquence UTE et un produit de contraste préférentiellement  $T_1$ .

Comme présenté dans le chapitre 3.1.3.2.1, la simulation a été effectuée avec le modèle de sphères pour estimer les effets de compensation de susceptibilité magnétique, qui rend compte de  $R_2^*$  (Figure 3.5). Que ce soit par la mesure ou par simulation,  $R_2^*$  montrait une même tendance de réduction progressive lorsque la concentration de Gd-DOTA augmente.  $R_2^*$  simulé pour le parenchyme pulmonaire est de l'ordre de  $611 \text{ s}^{-1}$ , ce qui est comparable à ce qui est mesuré par l'expérience ( $597,96 \text{ s}^{-1}$ ). En prenant en compte  $C_{\text{est1}} = 0,1054 \text{ mM}$  à 1 h post-administration, les valeurs de  $R_2^*$  obtenues par la mesure et par la simulation sont respectivement  $562,99 \text{ s}^{-1}$  et  $609,2 \text{ s}^{-1}$ . Par conséquent, la variation de  $R_2^*$  entre pré- et 1 h post-contraste obtenue par la mesure est de  $\sim 6\%$  par rapport à la variation simulée qui n'est que de  $\sim 0,3\%$ . Ces variations diffèrent d'un facteur 20. Cette différence de  $R_2^*$  vient de la différence de relaxivité, respectivement  $-332 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  (mesure) et  $-17,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  (modèle), avec un facteur  $\sim 20$ . Les modèles simplificateurs de sphères d'air distribuées aléatoirement dans de l'eau, et de décroissance exponentielle du signal dans les poumons peuvent être limités pour rendre compte de l'évolution du signal dans les poumons.

#### 4.3.4 Rehaussement dans le système cardiovasculaire

La courbe de RSE en moyenne dans le sang ( $n = 6$ ) montrait un rehaussement maximal de  $(5,44 \pm 0,47) \%$ , avec un taux d'élimination à l'ordre de 1,2% par heure, conduisant à un temps d'élimination caractéristique du sang de l'ordre de celui mesuré dans le parenchyme pulmonaire. Ce rehaussement de signal cardiovasculaire était environ 10 fois plus bas que celui de poumon. Ceci est

en accord avec la mesure de Berthezène et al. (258 - Berthezene 1993), qui a observé un changement limité de  $T_1$  dans le système circulatoire dans un protocole similaire.

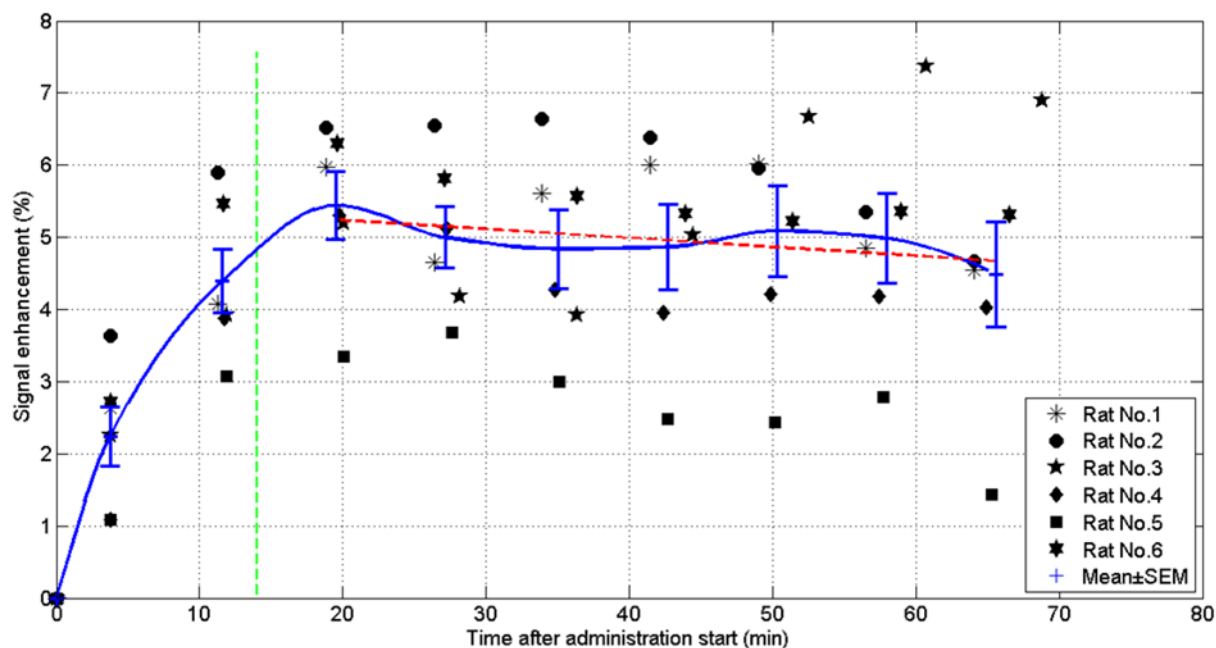


Figure 4.7. Le rehaussement relatif du signal cardiovasculaire évalué au cours du temps. Une variabilité inter-sujets a été observée, cependant le rehaussement de signal dans le sang restait faible avec un maximum inférieur à 6%.

#### 4.3.5 Distribution dans les poumons

L'analyse régionale du dépôt d'aérosol (Figure 4.8) montre une absence de différence significative entre les volumes antérieur vs. postérieur (49,48% vs. 50,52%), mais ont bien montré des différences significative dépendantes respectivement de gauche vs. droite (47,73% vs. 52,27%,  $p < 0,001$ ), tête vs. pied (55,01% vs. 44,99%,  $p < 10^{-4}$ ) et centrale vs. périphérique (52,26% vs. 47,74%,  $p < 0,01$ ). Les différences régionales présentaient un dépôt 9,52% plus élevé vers la droite, 22,28% vers la tête, et 9,47% vers le centre.



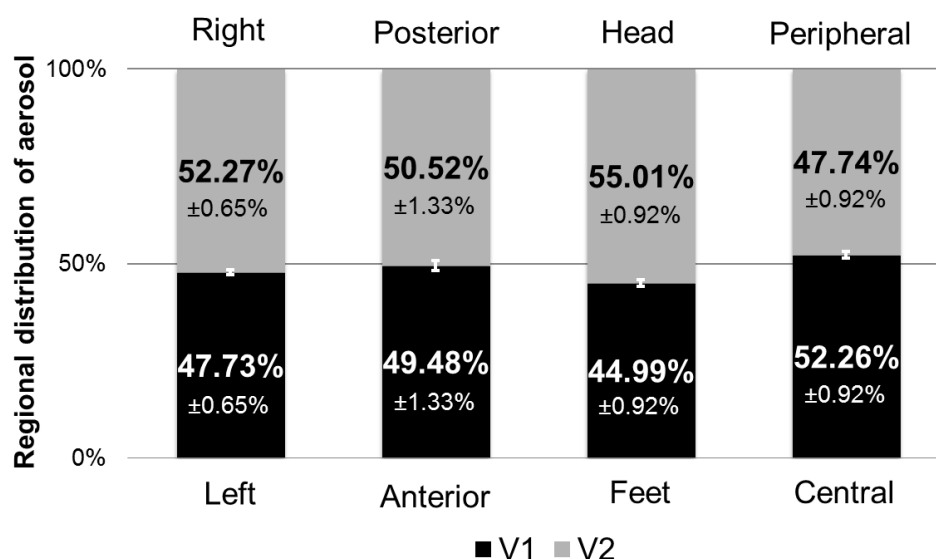


Figure 4.8. Le dépôt d'aérosol comme une fonction de la division des poumons est présenté comme un pourcentage moyen dans les 2 volumes égaux V1 et V2 sur les animaux ( $n = 6$ ) avec la SEM associée. L'homogénéité antérieur/postérieur ( $\sim 50\%$ ) et les hétérogénéités gauche/droite, tête/pied et centrale/périphérique ont été observées.

Afin de corrélérer la carte de concentration avec la position spatiale dans les poumons, une interprétation 3D pourrait être réalisée (Figure 4.9). Cette étape demande des outils de segmentation plus poussés. Nous montrons ici sa faisabilité à la suite d'une segmentation manuelle de certaines voies aériennes et lobes à partir de l'image à long TE (1,4 ms). La segmentation des lobes a été réalisée à partir des informations volumiques relatives (84 - De Backer 2009). De cette manière de visualiser et segmenter les poumons, la correspondance entre dépôt et position, profondeur ou lobe pourrait facilement être déterminée en faisant superposition la carte de concentration mesurée à l'interprétation anatomique 3D. Par exemple, la tâche correspondant au dépôt de Gd-DOTA plus élevé peut alors directement être localisée dans le lobe spécifique (Figure 4.9, le lobe intermédiaire droit). L'information morphologique pulmonaire et la quantité du dépôt peuvent alors être mises en correspondance (Figure 4.10). Dans l'exemple montré, la distribution lobaire montre un dépôt élevé dans le lobe intermédiaire droit ( $Q/V = 1,21$ ), un dépôt faible dans le lobe cardiaque droit ( $Q/V = 0,86$ ), ainsi qu'un dépôt homogène dans les autres lobes ( $Q/V \approx 1$ ). Le modèle morphologique utilisé ici pourrait potentiellement être généralisé et adapté aux poumons individuels d'autres animaux par des techniques de recalage de volume (259 - Sotiras 2013).

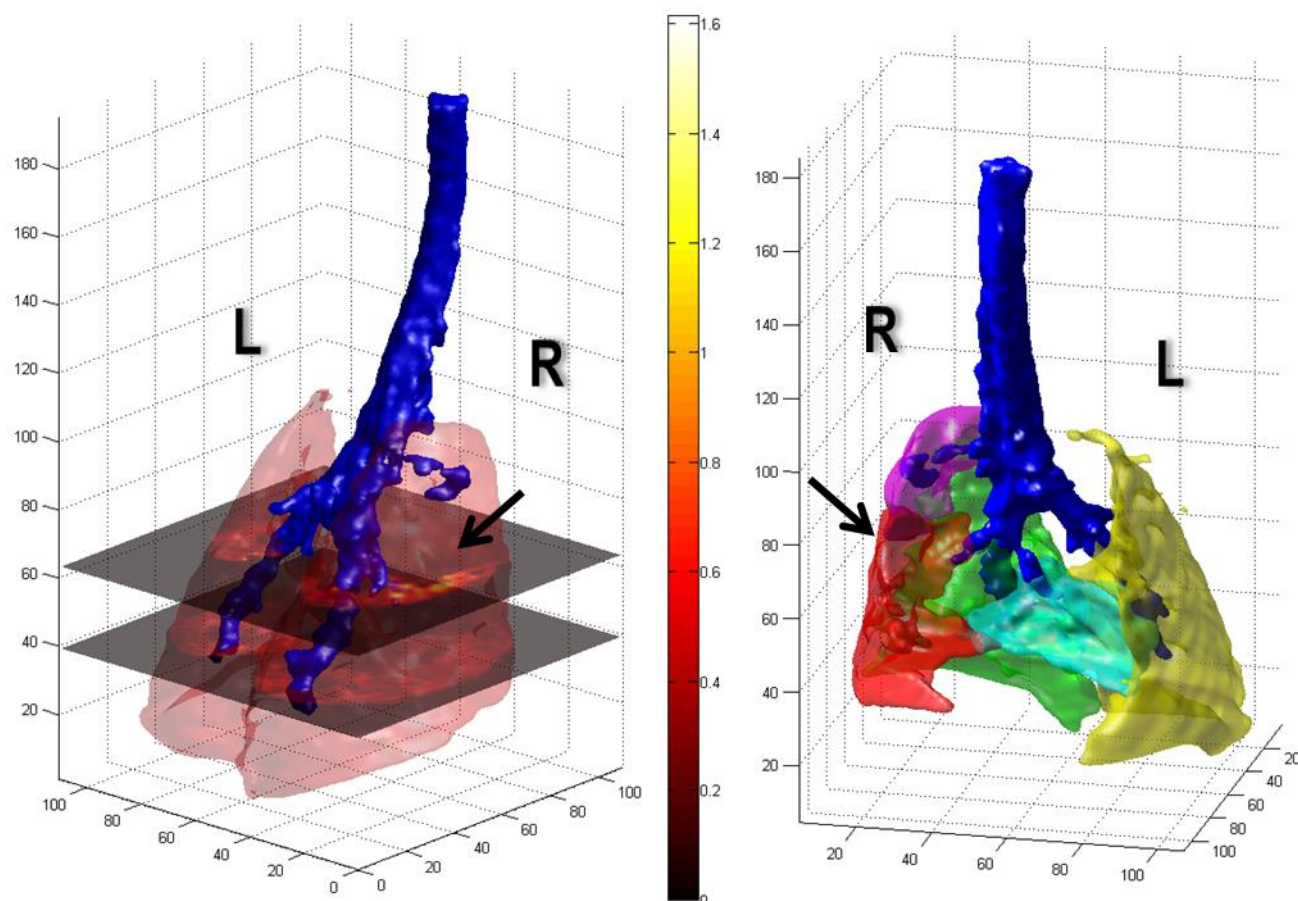


Figure 4.9. Visualisation 3D montrant la correspondance entre dépôt et profondeur, position et lobe. Une quantité plus importante de dépôt peut être localisée dans le lobe intermédiaire droit (marqué par la flèche noire). Les voies aériennes principales (trachée et quelques générations de bronche) sont en bleu et les lobes sont représentés en : magenta (lobe apical droit), rouge (lobe intermédiaire droit), vert (lobe diaphragmatique droit), cyan (lobe cardiaque droit) et jaune (lobe apical/diaphragmatique gauche).

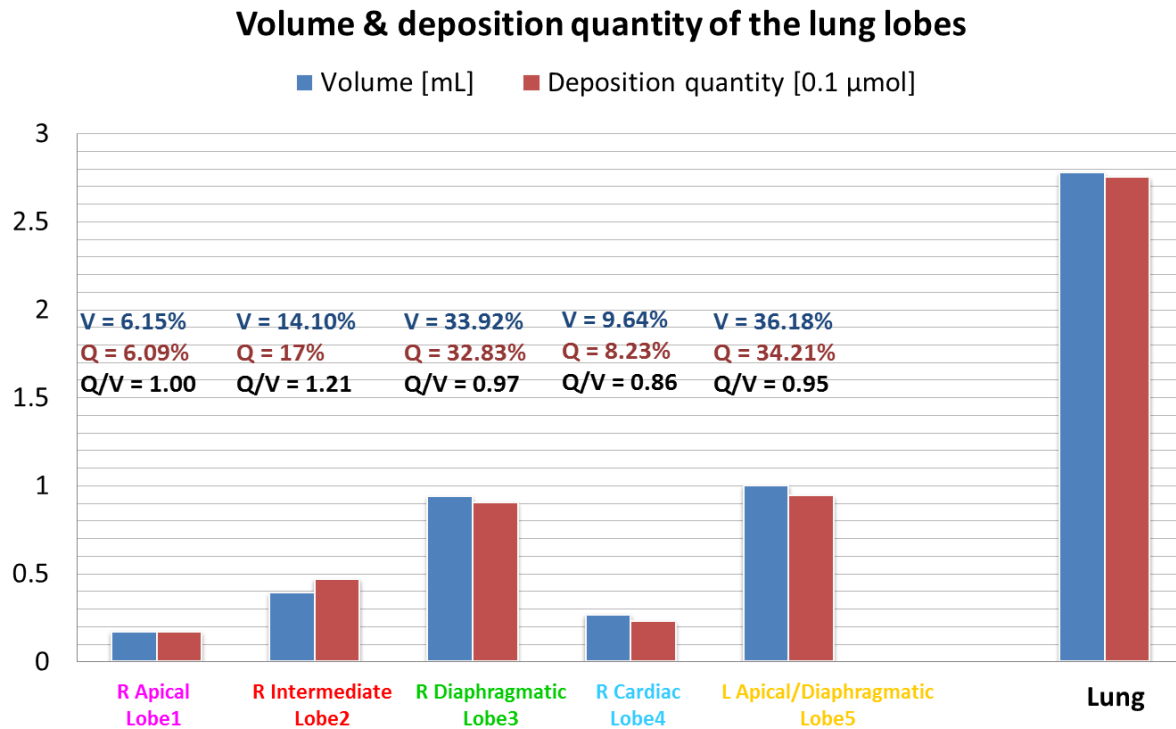


Figure 4.10. Le volume et la quantité de dépôts correspondants aux lobes pulmonaires segmentés sont présentés pour un animal représentatif. V, Q et Q/V sont respectivement la proportion de volume lobaire, la proportion de quantité du dépôt lobaire et le rapport entre quantité d'aérosol et volume.

#### 4.3.6 Corrélation entre les paramètres mesurés

La quantité totale d'aérosol déposée était négativement corrélée avec l'intensité de signal moyen du poumon lors de l'acquisition référence ( $R^2 = 0,74$ ,  $p < 0,001$ ) (Figure 4.11a) et était positivement corrélée avec  $R_2^*$  du poumon pré-contraste ( $R^2 = 0,82$ ,  $p < 10^{-4}$ ) (Figure 4.11b). De plus, l'intensité de signal et  $R_2^*$  pré-contraste étaient négativement corrélés ( $R^2 = 0,68$ ,  $p < 0,01$ ) (Figure 4.11c), montrant que ces deux paramètres sont liés.

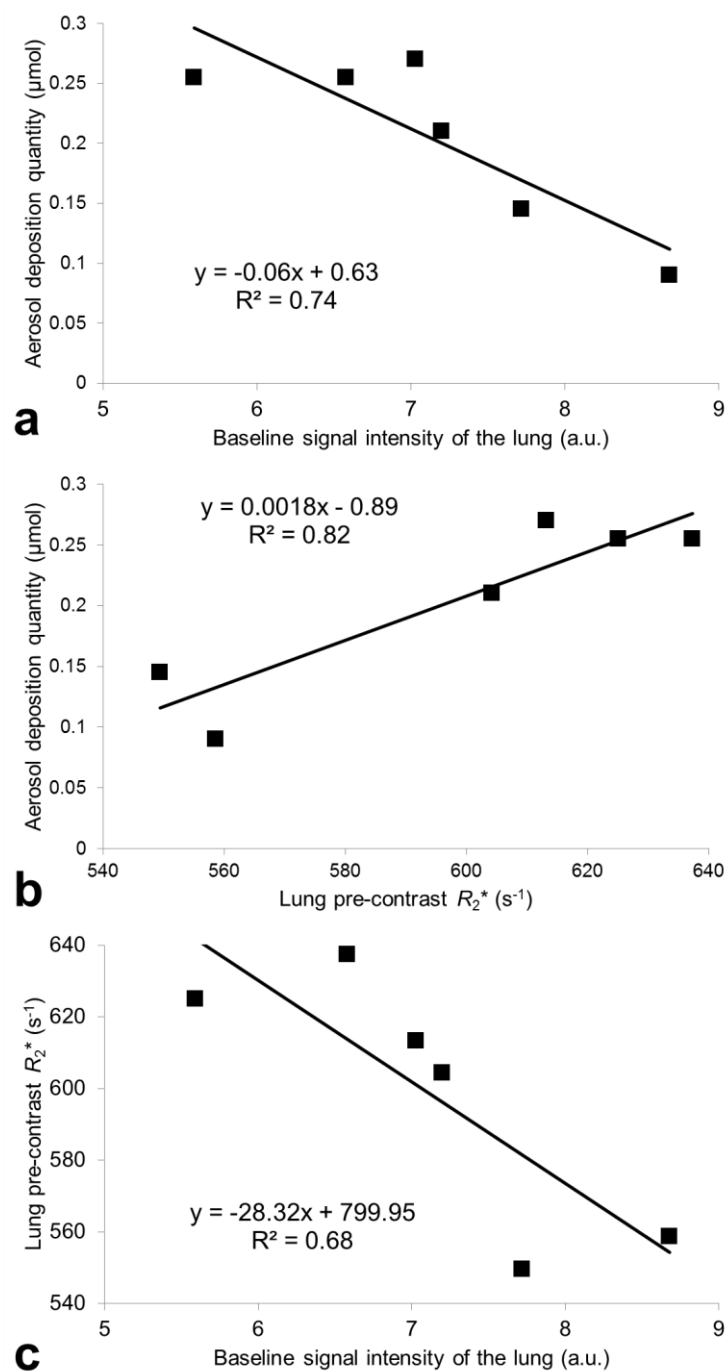


Figure 4.11. Corrélations observées entre dépôt d'aérosol et intensité de signal du poumon (a) et  $R_2^*$  (b) pré-contraste. Le signal pulmonaire et  $R_2^*$  pré-contraste sont également liés (c) ( $n = 6$ ).

## 4.4 Discussion

### 4.4.1 Synthèse du protocole d'imagerie

La nébulisation d'aérosol à base de Gd-DOTA chez le rat respirant spontanément, combinée avec

l'imagerie UTE, a été implémentée sur un système clinique à 1,5 T. Le protocole d'imagerie est faisable pour l'acquisition de volume résolu spatialement (0,5 mm isotrope) pour le poumon et s'est avéré reproductible sur six animaux. Un rehaussement de signal significatif dans le parenchyme pulmonaire (50% en moyenne) est obtenu pendant la nébulisation de courte durée. Cette méthode fournit la première cartographie quantitative de concentration du dépôt d'aérosol *in vivo* par IRM. Une séquence radiale 3D UTE pondérée en  $T_1$  a été utilisée pour sonder le dépôt d'aérosol, parce que (i) elle est peu sensible aux mouvements respiratoires, permettant une respiration spontanée pendant l'acquisition ; (ii) elle est moins sensible à  $T_2^*$  court dans les poumons, et à l'effet  $T_2^*$  induit par l'aérosol, par conséquent augmentant le signal du parenchyme pulmonaire pré-contraste, permettant la quantification du rehaussement de signal prévu lors de l'administration de l'aérosol ; (iii) La quantification de l'effet  $T_1$  n'est pas limitée par l'hétérogénéité du profil de coupe, comme c'est le cas d'acquisition 2D avec son excitation sélective (238 - Schabel 2008).

#### 4.4.2 Comparaison avec des études précédentes

L'administration en respiration spontanée est plus représentative d'une exposition chronique aux particules dans la toxicologie respiratoire et pour la délivrance de médicaments inhalés, par rapport à l'instillation intratrachéale. En effet, le RSE maximal, l'efficacité d'administration, et la distribution observée dans notre étude diffèrent de ceux obtenus précédemment dans d'autres études (209 - Suga 2002, 213 - Martin 2008, 212 - Sood 2008, 217 - Bianchi 2013). Suga et al. (209 - Suga 2002, 210 - Suga 2003) et Bianchi et al. (217 - Bianchi 2013) rapportaient un RSE plus élevé (~ 200% et 266%, respectivement) pour une dose administrée plus importante, respectivement 239  $\mu\text{mol/kg BW}$  et 120  $\mu\text{mol/kg BW}$ , qui sont des doses beaucoup plus élevées que la dose administrée estimée dans le poumon ici (1  $\mu\text{mol/kg BW}$ ). Le protocole d'imagerie proposé permet de quantifier la distribution de particule en utilisant des doses deux ordres de grandeurs plus faibles. Bien que, dans ce travail, seulement une petite fraction (~ 0,7%, comparé à la quantité de Gd introduit dans le masque) d'aérosol nébulisé soit effectivement administrée et mesurée dans les poumons, il conduit quand même à une proportion du dépôt intrapulmonaire beaucoup plus élevée que ce qui a été observé dans une étude précédente (0,0006%) avec une durée d'exposition de 2 heures dans une chambre d'inhalation par nez (213 - Martin 2008). Un MMAD plus petit des particules d'aérosol administrées pourrait partiellement expliquer l'amélioration d'efficacité : 2,5  $\mu\text{m}$  versus 5,6  $\mu\text{m}$ . Par ailleurs, une petite fraction de Gd-DOTA aérosolisé inhalé est suffisante pour obtenir ici un rehaussement de contraste significatif (~ 50%) pendant une durée de nébulisation courte (~ 15 min) effectué par une administration par le nez, niveau de rehaussement comparable au rehaussement (~ 20%) obtenu pendant une durée identique chez un cochonnet intubé et ventilé mécaniquement (212 - Sood 2008).

#### 4.4.3 Efficacité de l'administration

La taille de particule et le mode d'administration tous deux soulignent l'importance des propriétés de l'aérosol pour l'administration pulmonaire. L'efficacité de nébulisation pourrait être limitée ici par les pertes considérables dans la ligne d'entrée du gaz (> 90%), comme un nébuliseur adulte a été utilisé conjointement à des tubulures adaptées à la taille du rat. Le dépôt dans les voies aériennes

extrathoraciques pourrait également représenter une proportion importante du dépôt total. En particulier, le nez est un filtre performant pour les particules inhalées, parce que les rats respirent principalement par le nez (84 - De Backer 2009) et la respiration nasale réduit le dépôt d'aérosol dans les poumons de manière importante d'approximativement 50% (260 - Everard 1993). Pour augmenter l'efficacité d'administration, une possibilité est de préchauffer l'agent de contraste afin de réduire sa viscosité avant l'inhalation (166 - Mosbah 2008).

#### **4.4.4 Comparaison avec les autres modes d'administration**

Malgré une dose réduite et moins contrôlée dans notre étude, l'administration par le nez est plus à même de rehausser uniformément le signal du poumon et de générer des résultats plus représentatifs des propriétés aérodynamiques des particules. Une dispersion assez uniforme des particules dans les voies aériennes et les alvéoles a été démontrée ici. Puisque les propriétés aérodynamiques des particules d'aérosol représentent les facteurs principaux influençant le dépôt et la rétention des particules inhalées dans les poumons (173 - Leong 1998), le profil du dépôt pourrait être davantage comparé avec les mécanismes du dépôt et la ventilation régionale obtenus par simulations (261 - Apiou-Sbirlea 2010). Néanmoins, l'instillation intratrachéale produit un dosage précis mais une distribution intrapulmonaire moins uniforme, en particulier dans la région alvéolaire ; de plus, elle ne peut pas être utilisée pour déterminer les profils du dépôt des particules, en raison de la nature non-physiologique de l'administration (178 - Driscoll 2000). L'inhalation intratrachéale, impliquant l'intubation ou la trachéotomie, peut augmenter l'efficacité des dépôts, mais l'effet de taille aérodynamique des particules et d'uniformité de distribution ne seraient probablement pas comparables à ceux obtenus par voie nasale en respiration spontanée (173 - Leong 1998). Dans tous les cas, l'intubation endotrachéale chez le rat est une procédure délicate, à cause de la cavité orale et de la glotte étroites, en conséquence elle nécessite des compétences spécifiques avec des équipements élaborés et spécialement conçus pour cela (174 - Lizio 2001). A la place de l'intubation, la trachéotomie est une méthode alternative qui est invasive et empêche les études longitudinales. Dans une optique de transfert clinique pour l'imagerie fonctionnelle pulmonaire, l'administration par le nez est plus facilement transposable, alors que l'administration intratrachéale (inhalation ou instillation) n'est pas pratique dans un contexte de routine en raison de l'inconfort du patient et du profil du dépôt non-uniforme.

#### **4.4.5 Hypothèse de l'échange rapide**

Les gouttelettes contenant les substances solubles déposées sur la surface de poumon diffusent rapidement dans les films liquidiens de l'épithélium (epithelial lining fluid) et devient disponible pour l'absorption (155 - Olsson 2011). L'absorption trans-épithéliale des solutés hydrophile inhalés à travers la barrière sang-gaz est alors relativement lente (avec une absorption caractérisée par une demi-vie à l'ordre des heures (154 - Patton 2004), correspondant au temps d'élimination mesuré ici), puisque elle dépend de la diffusion passive à travers de jonctions intercellulaires de l'épithélium et de l'endothélium (262 - O'Doherty 1997). Ce transfert a été observé expérimentalement comme une voie principale d'élimination des poumons en utilisant un traceur SPECT, le  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA, nébulisé (195 -

Bondesson 2007), une solution hydrophile similaire à Gd-DOTA utilisé dans notre étude. Le rehaussement de signal cardiovasculaire plus bas en comparaison à celui des poumons suggère une faible concentration dans le plasma, ce qui indique que le rehaussement était limité dans les compartiments extravasculaires comme montré dans Montgomery et al. (205 - Montgomery 1987). Pendant la diffusion des particules de l'agent de contraste dans l'épithélium et l'endothélium, l'hypothèse d'un échange rapide de l'eau avec de faible concentration peut toujours être appropriée (263 - Donahue 1997). Ces éléments indiquent que la supposition de linéarité entre  $R_1$  et concentration est raisonnable.

#### 4.4.6 Distribution régionale du dépôt

L'hétérogénéité du dépôt entre antérieur/postérieur n'était pas détectable, tandis que des hétérogénéités gauche/droite, tête/pied, et central/périphérique ont été observées. Ces résultats suggèrent que les effets gravitationnels générés par la position couchée sur le ventre n'ont pas affecté beaucoup le dépôt d'aérosol. Toutefois, la différence gauche/droite pourrait être causée par l'asymétrie géométrique du poumon, avec une morphologie plus complexe des lobes à droite induisant de l'impaction ; tandis que les différences tête/pied et central/périphérique pourrait être dues à la durée d'administration limitée, une fréquence respiratoire plus faible pendant l'anesthésie, et le retour possible de particules d'aérosol dans les poumons pendant l'expiration.

#### 4.4.7 Dépôts localisés

Des taches brillantes (hot spots) ont été observés dans des régions clairement définies, tels que les lobes apical et intermédiaire. Puisque aucune variation anatomique spécifique n'a été observée dans les images IRM et qu'aucun état pathologique n'a été considéré dans les animaux, les taches localisées pourraient être liées à des facteurs variables tels que la géométrie locale individuelle de voies aériennes, la physiologie, ou les profils respiratoires. Ces taches brillantes avec des dépôts plus concentrés sont en général observées au niveau de la carène et des zones de bifurcation (264 - Schlesinger 1982, 265 - Martonen 1992, 266 - Churg 1996). L'accumulation locale des particules dans les zones de bifurcation peut être jusqu'à deux ordres de grandeurs plus élevé que la dose moyenne pour les voies aériennes et arrive préférentiellement avec des particules de taille plus grande, pour lesquelles l'impaction inertielle devient dominante (267 - Balásházy 2003). Comme mesuré sur les images IRM, le diamètre des voies aériennes responsable d'un dépôt plus élevé varie de 1,5 à 2 mm (en moyenne 3-4 pixels). Comparé à une mesure précédente réalisée par Oakes et al. (268 - Oakes 2012), ces voies aériennes correspondent aux générations de 1 à 4 pour le rat Wistar. Les particules d'aérosol délivrées par le nébuliseur avaient un MMAD proche de 2,5  $\mu\text{m}$ , qui sont principalement favorisées par l'impaction inertielle dans ces régions (269 - Oakes 2014). En particulier dans les bronches majeures gauche et droite, les paramètres comme la quantité de mouvement et la courbure locale élevée de bifurcations pourraient avoir joué un rôle efficace dans le dépôt des particules larges dans les voies aériennes proximales. L'obstruction par du mucus induit par le dépôt de particules sur la surface épithéliale de voies aériennes pourrait également avoir influencé la répartition (270 - Burgel 2010). De plus, à cause de la nature hygroscopique de Gd (271 - Averill 2011), la taille d'aérosol

inhalé dans les voies aériennes tend à augmenter dans l'environnement de 100% humidité relative. De ce fait, l'obstruction simple de gouttelettes d'aérosol pourrait s'être produite dans les voies aériennes et pourrait avoir conduit à un effet d'aspiration plus locale dans des bronches lobaires. Ces différentes causes possibles engendrent un dépôt de particules plus important, de telle sorte que les cinétiques d'élimination dans ces régions hyper-intenses peuvent varier. En effet, les cinétiques dans ces régions sont différentes. Pour certaines régions hyper-rehaussées ( $n = 2$ ) les tendances de la cinétique étaient similaires à celles des régions « normales » (une augmentation jusqu'à la fin de l'administration suivi par une décroissance progressive lors de période d'élimination). Cela suggère que le dépôt s'est produit principalement pendant l'administration. En revanche, certaines autres régions hyper-rehaussées ( $n = 2$ ) ont manifesté des comportements différents pendant la période normale d'élimination. Cela est potentiellement un indicateur de la redistribution de l'agent de contraste dans le poumon.

#### **4.4.8 Elimination pulmonaire et cardiovasculaire**

Le temps d'élimination mesuré dans le système cardiovasculaire était similaire au temps d'élimination du parenchyme pulmonaire, beaucoup plus long que la clairance typique de Gd-DOTA après injection dans le système cardiovasculaire ( $3,4 \text{ min}^{-1}$  de clairance rénale après injection intraveineuse de Gd-DOTA chez le rat (272 - Baumann 2000)). La pharmacocinétique de l'aérosol Gd-DOTA inhalé apparaît essentiellement déterminée par le passage de particules Gd du poumon vers le sang au niveau alvéolaire-capillaire. Globalement, l'évolution du RSE après l'arrêt de l'administration d'aérosol pourrait nécessiter plus d'analyse et de modélisation pour déterminer si la cinétique peut être utilisée comme un marqueur physiopathologique de l'inflammation de poumon.

#### **4.4.9 Effet de $R_2^*$**

Une séquence UTE a été utilisée pour avoir une sensibilité limitée aux variations de taux de relaxation apparente  $R_2^*$  après l'administration. Puisque la décroissance du signal dans le poumon est complexe (40 - Cutillo 1999), supposer une décroissance exponentielle ne reflète que partiellement les tendances de dispersion de fréquence de résonance induites par l'inhomogénéité du champ magnétique, et  $R_2^*$  est un paramètre phénoménologique représentant cela. Les deux hypothèses, soit de négliger les variations, soit de supposer une décroissance exponentielle sont des approximations. La comparaison de concentration estimée utilisant les deux modèles offre une idée de l'erreur limitée de modélisation entre eux, environ 5% ici. Ce résultat met en avant l'avantage de l'utilisation d'une séquence à temps d'écho très court pour mesurer une concentration plus précise basée sur le rehaussement  $T_1$  dans les poumons. Pour réduire davantage la sensibilité à la variation  $R_2^*$ , des échos encore plus courts pourraient être utilisés (400  $\mu\text{s}$  ici, qui pourraient encore être réduit à la centaine de  $\mu\text{s}$ ).

La tendance observée de réduction entre les valeurs de référence et post-administration de  $R_2^*$  est probablement due à une réduction de différences de susceptibilité magnétique à l'interface d'air-tissu, lorsqu'une substance paramagnétique est dissoute dans le tissu diamagnétique, donc réduisant la susceptibilité diamagnétique moyenne du parenchyme. Cet effet a été précédemment observé après des



injections intraveineuses d'agent de contraste superparamagnétique, permettant de compenser la susceptibilité du parenchyme pulmonaire avec celle du gaz alvéolaire (273 - Vignaud 2005). Cet effet similaire ici tend à augmenter  $T_2^*$  avec une quantité d'aérosol déposé. Cela suggère un développement de méthode de quantification basée sur ce paramètre avec un rehaussement de signal attendu au lieu d'une réduction habituellement observée dans les applications courantes. Pour les agents superparamagnétiques pour lesquelles le rapport entre les relaxivités transversale apparente et longitudinale est proche de 10 (274 - Gossuin 2009), le rehaussement  $T_2^*$  pourrait être plus important, et l'utilisation de séquences pondérée en  $T_2^*$  pourraient être considérée pour quantifier ces effets. Quant au Gd-DOTA utilisé ici, ce rapport est proche de 1, et le rehaussement  $T_2^*$  après une heure est limité, jusqu'à quelques pourcents, tandis que le rehaussement  $T_1$  atteint 40%. Ce résultat guide évidemment le choix du type de contraste pour détecter la présence de l'aérosol à base de Gd-DOTA.

#### 4.4.10 Liens entre quantité de dépôt et paramètres pré-contraste

Le travail de Takahashi et al. (275 - Takahashi 2010) suggère que l'intensité de signal du parenchyme pulmonaire sur les images UTE est déterminée par la densité tissulaire et l'effet de susceptibilité provenant de l'interface air-tissu. L'intensité du signal RMN (pour TE = 0,4 ms) et  $R_2^*$  de référence sont bien évidemment corrélés. Ces deux paramètres caractérisent les aspects différents de parenchyme pulmonaire. Pour l'acquisition de référence, une intensité de signal moyenne plus élevée montre une densité de parenchyme plus grande, tandis que  $R_2^*$  plus faible indique des espaces aériennes plus petits (dominé par l'effet de susceptibilité) (36 - Olsson 2007, 275 - Takahashi 2010). Les corrélations significatives que nous avons observé entre la quantité d'aérosol déposée et le signal moyen avec  $R_2^*$  pré-contraste suggère que le dépôt d'aérosol est réduit lorsque les parenchymes pulmonaire est plus dense, donc ayant des espaces aériens moins larges.

#### 4.4.11 Transfert potentiel clinique

Le protocole d'imagerie a été effectué *in vivo* chez les rats avec une antenne RF clinique et un agent de contraste conventionnel en IRM, en utilisant une voie d'administration pertinente en clinique sur un système d'IRM 1,5 T standard. Les résultats précliniques obtenus fournissent donc une perspective de transfert clinique. D'une part les mécanismes de contraste à 1,5T sont similaires chez l'homme, d'autre part l'appareillage et le mode d'administration sont adaptés. Notamment, l'administration a été réalisée à l'aide d'un nébuliseur compatible IRM, sans avoir besoin de déplacer l'animal, donc permettant d'une comparaison robuste quantitative voxel par voxel entre pré- et post-administration.

Dans cette expérience préclinique, la dose d'aérosol déposée détecté dans les poumons de rats est d'environ 1  $\mu\text{mol/kg BW}$ , ce qui est bien plus faible que la dose moyenne injectée en i.v. en clinique de 100  $\mu\text{mol/kg BW}$  (276 - Herborn 2007). Cela suggère qu'une dose réduite pourrait être administrée au patient, avec des procédures d'administration similaire, et que le rehaussement de signal doit être observé dans le parenchyme pulmonaire chez l'homme. Le suivi de la cinétique d'élimination des poumons de l'ordre de quelques heures, les niveaux de doses relativement faibles mesurés ici dans le sang des animaux, et une élimination urinaire estimée précédemment être complète en moins de 30

heures (258 - Berthezene 1993) suggèrent une toxicité potentiellement limitée. Pour transférer chez l'homme, les nébuliseurs sont plus adaptés et la possibilité d'entraîner le patient à l'inhalation peuvent permettre une délivrance plus efficace de l'agent de contraste aérosolisé au poumon en limitant les pertes dans les conduits. Ici, la séquence 3D UTE radial permettait d'assez longues acquisitions (7,5 min) avec des artéfacts de mouvement négligeables. Ces artéfacts limités tirent profit des cycles respiratoires stables chez les rats anesthésiés et de l'aspect « aléatoire » des artéfacts de mouvement avec l'échantillonnage radial. Chez l'homme, pour avoir une durée d'acquisition raisonnable et pour prendre en compte les effets de fluctuations respiratoires, il est possible d'ajouter à la 3D UTE une compensation respiratoire ou navigateur, ou bien l'implémentation d'acquisitions UTE 2D en apnée pourraient être testées. Dans notre étude, l'antenne corps-entier intégrée au système était employée pour la transmission, de telle sorte que l'angle de basculement pouvait raisonnablement être considéré comme homogène à l'intérieur de région centrale d'imagerie. L'uniformité de réception variait approximativement de 50% sur l'étendue des poumons (vérifié expérimentalement à partir des données et sur un fantôme homogène). Néanmoins, l'analyse quantitative est basée sur le rapport de signal, et il est donc intrinsèquement normalisé par la sensibilité de l'antenne de réception. Les profils de sensibilité de l'antenne de réception est une voie possible pour permettre une certaine sélectivité spatiale en 3D UTE lorsqu'une excitation non-sélective est appliquée comme ici. Un réseau d'antennes cardiaque ou pulmonaire permettrait une telle sélection spatiale chez l'homme. De plus, les approches pour optimiser les excitations sélectives peuvent être combinées pour l'imagerie UTE, tels que l'utilisation de la méthode d'excitation sélective avec taux variable (VERSE) (277 - Conolly 1988).

## 4.5 Conclusion

En résumé, le protocole 3D UTE combiné avec l'inhalation par le nez d'aérosol de Gd-DOTA permet de rehausser d'une manière significative et homogène le parenchyme pulmonaire chez le rat. Le rehaussement  $T_1$  permet de quantification de la distribution totale et régionale, en plus de dépôt déterminés avec la résolution spatiale de l'imagerie. Une tendance d'augmentation de  $T_2^*$  a été observée, ce qui est explicable par des effets de compensation de susceptibilité. Ces derniers effets avaient une influence limitée sur la quantification. L'administration par respiration spontanée ici est plus représentative de l'exposition chronique aux particules en toxicologie respiratoire et pour la thérapie par inhalation. Cette stratégie d'imagerie fonctionnelle liée à la ventilation et permettant la caractérisation de clairance, appliquée sur un système clinique avec un dispositif de nébulisation clinique et une dose faible inhalée, invite à une transposition de la technique chez l'homme.

## **Chapitre 5.**

# **Mesure des dépôts par IRM sur modèles asthmatiques et emphysémateux**

---

Cette thèse concerne principalement la mise en place de méthodes de caractérisation des dépôts d'aérosol par IRM. Dans cette partie, l'IRM-UTE avec nébulisation de produits de contraste est appliquée sur des modèles de maladies pulmonaires. Dans le cadre du projet OxHelease, des modèles de maladies respiratoires ont été développés chez le rat par le Centre de Recherches Biologiques [CERB, Baugy, France] et une étude multimodale d'imagerie incluant de la tomodensitométrie aux rayons X (micro-CT) ainsi que de l'imagerie nucléaire (SPECT, single photon emission computed tomographie) a été mise en place au Centre d'Imagerie du Petit Animal [CIPA, CNRS-TAAM UPS44, Orléans, France]. Deux modèles de maladies respiratoires chroniques ont été évalués, respectivement l'asthme et l'emphysème, qui sont généralement traités par inhalation de médicaments nébulisés (278 - Capstick 2012). L'asthme implique une inflammation chronique, le remodelage des voies aériennes et des bronchoconstrictions. L'emphysème est caractérisé par la destruction de parois alvéolaires ce qui conduit à l'élargissement des espaces aériens distaux. Dans cette partie, le développement de ces modèles est d'abord décrit, ainsi que l'adaptation du protocole expérimental par IRM. Un objectif est de déterminer les paramètres RMN les plus pertinents pour caractériser les modèles.

---

### ***5.1 Développement des modèles animaux***

#### **5.1.1 Développement et caractérisation des rats asthmatiques**

##### ***5.1.1.1 Modèle asthmatique***

La procédure expérimentale pour développer et valider les modèles a été effectuée par le CERB. Des rats femelles Wistar [JANVIER breeding centre, France ; poids entre 160 et 200 g] ont été sensibilisés par injection intrapéritonéale (i. p.) d'ovalbumine (OVA, 1 mg/animal) émulsifié dans de l'hydroxyde d'aluminium ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ , 50 mg/animal) (121 - Raza Asim 2010). Les rats non-injectés sont utilisés comme contrôles.

La sensibilisation à l'OVA a d'abord été vérifiée par une épreuve d'anaphylaxie cutanée passive (PCA) (279 - Braga 1976). Du sérum est obtenu à la suite d'une prise du sang chez les animaux OVA à 14 et 20 jours après l'injection initiale. Ce sérum est administré par injection intradermique (i. d.) sur le flanc des animaux non-injectés. Ces animaux non-injectés sont ensuite challengés 24 h post-injection par une stimulation intraveineuse d'OVA. Une réaction anaphylactique locale peut alors être

observée. Celle-ci est caractérisée par une augmentation de perméabilité vasculaire mesurée par la méthode dite Evans blue dye (EBD) (280 - Evans 1914). Si cette réaction est obtenue chez des rats contrôles à partir de l'injection de sérum de rats sensibilisés, cela confirme la sensibilisation du rat injecté en i.p. initialement, qui entre alors dans le groupe asthmatique (Figure 5.1).

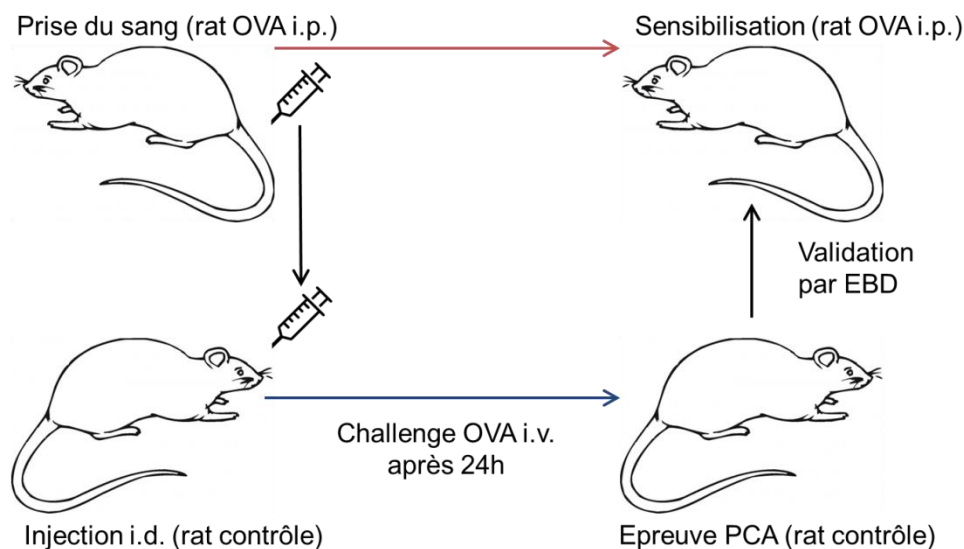


Figure 5.1. Schéma décrivant la procédure pour vérifier la sensibilisation à l'OVA. i.p. dans le groupe de rats asthmatiques. Abréviations : i.p. : intrapéritonéale ; i.d. : intradermique ; i.v. : intraveineuse ; PCA : anaphylaxie cutanée passive ; EBD : Evans blue dye.

#### 5.1.1.2 Induction de la crise d'asthme

Pour produire la crise d'asthme, un challenge à l'OVA doit être effectué juste avant l'investigation par imagerie (Figure 5.2). Les rats traités à l'OVA ont été placés dans une chambre fermée et respiraient spontanément pendant 20 minutes un aérosol contenant 5% d'OVA généré par un nébuliseur [ATOMISOR® NL9 minidose, Diffusion Technique Française, Saint-Etienne, France]. Ce nébuliseur produisait un aérosol avec un MMAD de 4,4  $\mu\text{m}$ . Quant aux rats contrôles, ils respiraient un aérosol de sérum physiologique à 0,9% pendant 20 minutes. Les symptômes asthmatiques, caractérisés par une bronchoconstriction et une augmentation de taux respiratoire, sont observées 1 à 2 heures après le challenge. Les symptômes induits se maintiennent ensuite pendant plus de 2h et disparaissent à 24h.

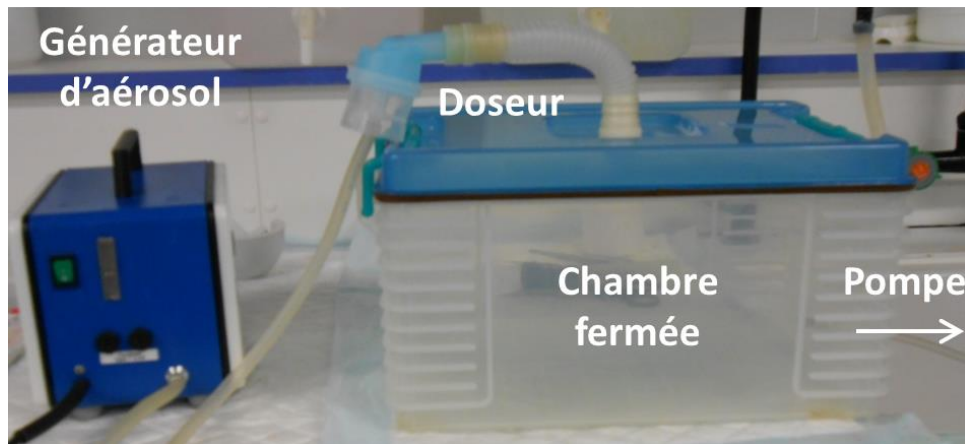


Figure 5.2. Photo du générateur d'aérosols et de la chambre de nébulisation pour réaliser le challenge sur les rats asthmatiques. Une pompe à vide (non visible sur la photo) servait à extraire le nébulisat de la chambre.

Le premier challenge a été réalisé 4 semaines post-sensibilisation avec le protocole décrit précédemment. La reproductibilité des symptômes asthmatiques a été vérifiée par d'autres challenges : 7 jours plus tard (5 semaines post-sensibilisation) et 7 semaines plus tard (11 semaines post-sensibilisation). Les rats contrôles étaient également challengés avec un aérosol d'OVA pour comparer les résultats obtenus avec l'aérosol de sérum physiologique. Les réponses des rats sensibilisés à l'OVA étaient similaires et les rats contrôles étaient confirmés par l'absence de réponse notable quelque-soit l'aérosol utilisé. Un schéma récapitule la procédure de validation du challenge (Figure 5.3).

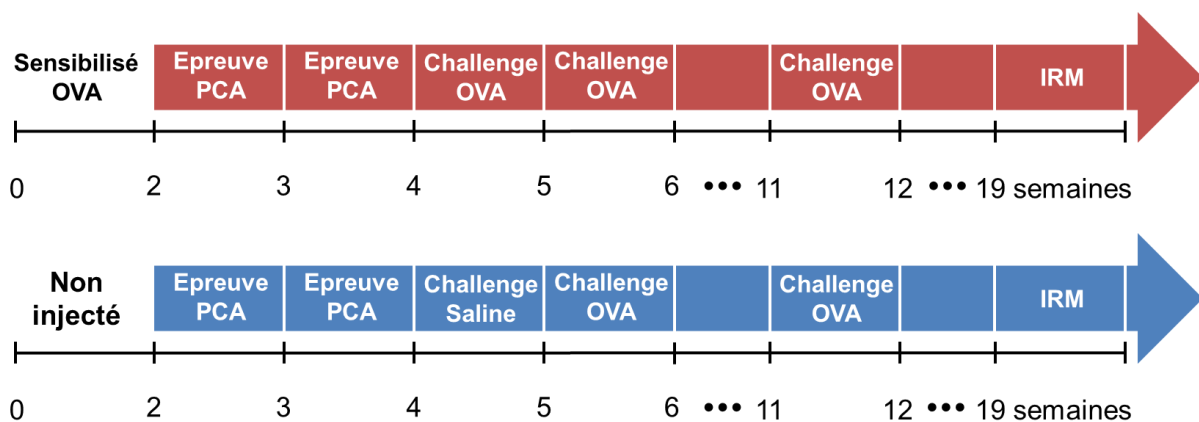


Figure 5.3. Schéma synthétisant le protocole de réalisation du modèle de rats asthmatiques (en rouge) et rats contrôles correspondant (en bleu).

#### 5.1.1.3 Mesure de paramètres respiratoires pour caractériser la crise d'asthme

Après chaque challenge à l'OVA, un certain nombre de paramètres respiratoires ont été caractérisés par la méthode de pléthysmographie corps entier afin d'évaluer les effets de la sensibilisation. Cette technique permet d'extraire du suivi de la respiration un index de résistance des voies aériennes (noté PenH), la fréquence respiratoire (RR), le débit volumique maximal inspiratoire et expiratoire (PIF, PEF), le temps d'inspiration et d'expiration (IT, ET), le volume courant (VC) et le volume par minute (MV). Les animaux sont placés dans le système de pléthysmographie environ 30 minutes post-

challenge et la respiration était enregistrée pour une période de 4 heures.

Le paramètre principal reflétant l'asthme est donné par PenH (enhanced-pause) qui reflète l'effort respiratoire (281 - Chong 1998) et qui corrèle à la résistance spécifique des voies aériennes. PenH est défini comme le rapport entre les débits volumiques maximaux inspiratoire et expiratoire PEF et PIF :

$$PenH = \frac{pause.PEF}{PIF}, \quad (5.1)$$

avec

$$pause = \frac{te}{tr} - 1, \quad (5.2)$$

où  $te$  est la durée de l'expiration et  $tr$  appelé temps de relaxation dans cette technique qui correspond au temps nécessaire pour expirer 65% du volume courant.

#### 5.1.1.4 Paramètres respiratoires chez les groupes contrôle et asthmatique

Pendant les challenges effectués respectivement à 4<sup>ème</sup> semaine (S4), à 5<sup>ème</sup> semaines (S5) et à 11<sup>ème</sup> semaines (S11), les effets suivants ont été observés chez les animaux sensibilisés à l'OVA (Table 5.1):

- une augmentation significative de PenH (Figure 5.4a),
- une augmentation de la fréquence respiratoire,
- une augmentation du débit maximal inspiratoire et expiratoire,
- une diminution du temps d'inspiration et d'expiration.

No.	Challenge	PenH	ET	IT	RR	PIF	PEF	VC	MV
S4	OVA	+++	--	--	++	+++	+++	0	+
S5	OVA	++	--	--	++	++	++	0	0
S11	OVA	+++	--	--	++	+++	+++	0	++

Table 5.1. Résumé des paramètres respiratoires obtenus chez les rats asthmatiques. Abréviations : + : augmentation ; - : diminution ; 0 : pas de variation.

Parmi tous ces paramètres, l'observation d'une augmentation de PenH est considérée comme un symptôme asthmatique significatif. Ces effets se produisent environ 2 h après le challenge et durent plus de 2 h, comme présenté sur la figure ci-dessous.

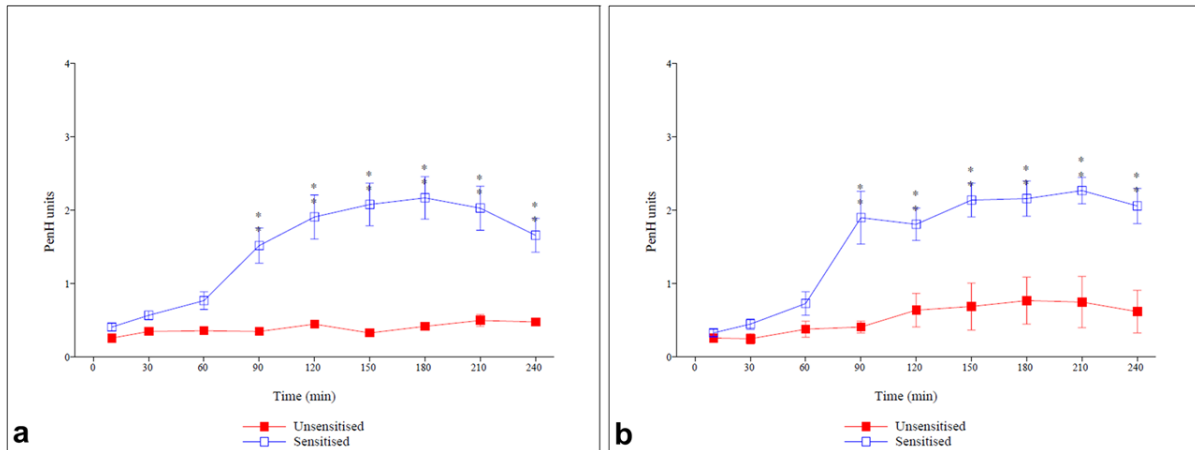


Figure 5.4. Evolution temporelle à la suite d'un challenge de l'index de résistance des voies aériennes (exprimé en unité de PenH) pour les rats sensibilisés (bleu) et contrôles (rouge) 4 semaines (a) et 11 semaines (b) post-sensibilisation. L'analyse statistique des mesures répétitives a été effectuée par un test de Dunnett et comparé au groupe contrôle (différences significatives avec  $P \leq 0,01$  indiqué par le symbole \*).

#### 5.1.1.5 Synthèse des caractéristiques globales des animaux

Un total de 6 rats sensibilisés à l'OVA ( $294 \pm 21$  g) et de 2 rats contrôles (312 g) ont été confirmés par la méthode de pléthysmographie. Les rats ont été caractérisés par IRM 19 semaines post-sensibilisation. Pour synthétiser, le poids et le paramètre PenH sont rapportés dans le tableau ci-dessous (Table 5.2). On utilisera les numéros notés dans ce tableau pour simplifier la présentation des résultats par la suite.

	Contrôle		Sensibilisé à l'OVA					
No. Animal	1AC	2AC	3A	4A	5A	6A	7A	8A
No. d'étude CERB	1302704	1302706	1302683	1302688	1302689	1302685	1302686	1302687
Poids (g)	312	312	266	309	303	295	319	273
index de résistance de voie aérienne en fonction du temps (en h)								
t = 2h	0,40	0,42	1,52	2,60	1,55	1,06	3,01	1,70
Moyenne sur 4h	0,36	0,40	1,06	1,99	1,32	1,30	1,61	1,46

Table 5.2. Numéro des rats pour l'étude par IRM et référence du CERB. Poids lors de l'IRM et index de résistance des voies aériennes à 2 heures et moyenne sur 4 heures pour les rats contrôles et pour les rats sensibilisés à l'OVA. Les notations AC = Asthme-Contrôle et A = Asthme seront utilisées par la suite.

### 5.1.2 Développement et caractérisation des rats emphysémateux

#### 5.1.2.1 Modèle emphysémateux

Un modèle d'emphysème du rat bien établi est celui induit par l'administration intratrachéale d'élastase pancréatique porcine (PPE). L'instillation de PPE conduit à un agrandissement rapide et

significatif des espaces aériens pulmonaires, suivi par une accumulation aigüe de neutrophiles et de macrophages dans les poumons (282 - Emami 2008).

La procédure expérimentale a été effectuée par le CERB. Avant l'instillation avec de l'élastase ou avec une solution saline, les animaux étaient mis dans une cage à diurèse sans nourriture ni eau pour collecter les urines du matin pendant 4 heures. Les volumes urinaires étaient mesurés et les échantillons collectés gelés afin de déterminer les niveaux de glycosaminoglycane (GAG) et de créatinine. Une prise de sang était faite pour déterminer les niveaux de base des paramètres hématologiques. La veille du dosage, les animaux étaient mis à jeun avec de l'eau seule. Le jour du dosage, les animaux étaient anesthésiés par inhalation d'isoflurane. L'élastase ou une solution saline étaient administrés aux rats *via* la voie endotrachéale avec un volume fixe de 0,2 mL/animal en utilisant une seringue dédiée [Penn-Century, Inc., Wyndmoor, PA]. Quatre jours après l'instillation, les échantillons urinaires étaient collectés à nouveau comme décrit précédemment. Des échantillons sanguins ont ensuite été collectés une fois par semaine pour contrôler les paramètres hématologiques. Après l'étude par IRM, les animaux ont été euthanasiés (overdose d'anesthésique gazeux) et les poumons ont été collectés pour caractériser les lésions pulmonaires par histologie.

Le modèle retenu ici utilisait des rats mâles Wistar [JANVIER breeding centre, France ; poids entre 200 g et 250 g]. Trois groupes ont été établis : (i) groupe contrôle ( $n = 6$ , solution saline, 0,2 mL/animal), euthanasiés à 12 semaines post-instillation ; (ii) groupe instillé avec de l'élastase à 25 UI/100 g BW, euthanasiés à 4, 8 ou 12 semaines post-instillation ( $n = 6$  pour chaque sous-groupe) ; (iii) groupe de rats plus petits (entre 170 g et 200 g) instillés avec de l'élastase (25 UI/100 g BW), euthanasiés à 8 semaines post-instillation.

#### 5.1.2.2 *Résultat de l'induction à l'élastase*

L'examen histologique montrait que l'instillation de l'élastase induisait l'emphysème caractérisé avec un espace alvéolaire élargi. Une cotation des lésions a été établie par l'anatomopathologiste et l'intensité de l'emphysème a été graduée selon 4 grades caractérisant l'élargissement des espaces alvéolaires (voir annexe B) : 0 non élargi ; 1 légèrement élargi ; 2 modérément élargi ; 3 notablement élargi. Les résultats ont été comparés entre groupes et sur 3 lobes principaux parmi les 5 lobes du poumon de rat, respectivement lobe crâniale droit, lobe caudal droit et lobe gauche. L'emphysème était déjà observé 4 semaines après l'instillation de l'élastase (groupe (ii)). Avec le temps, une augmentation légère de l'intensité des lésions a été remarquée principalement entre les semaines 4 et 8. Mis à part cet effet, aucun changement dans les autres paramètres mesurés n'a été observé. Ceci indique que l'examen histologique est la seule méthode permettant l'évaluation de l'intensité d'emphysème disponible dans ce travail.

Entre 8 et 12 semaines, aucune augmentation dans l'intensité de lésion n'a été observée, cependant l'emphysème apparaissait plus homogène, que ce soit entre les animaux du même groupe (groupe (ii)) et intra-animal (entre les 3 lobes décrit ci-dessus).



Chez les animaux plus petits (groupe (iii)), l'emphysème montrait une meilleure homogénéité inter-animal et intra-animal, comparés aux groupes (ii). A 8 semaines, l'index moyen reflétant l'emphysème était plus élevé que chez les animaux plus grands à 12 semaines (1,9 vs. 1,2). Cela suggère que l'emphysème provoqué est plus prononcé et plus homogène inter-animal et intra-animal chez les animaux plus petits.

D'après le suivi de l'évolution d'emphysème, les lésions emphysemateuses augmentaient jusqu'à 8 semaines et restaient ensuite stable jusqu'à 12 semaines. Pour réaliser les études par imagerie, il a donc été retenu d'utiliser les rats à 8-12 semaines post-installation. Après la séance d'imagerie, les poumons seraient donc prélevés pour déterminer le grade d'emphysème par histologie.

#### 5.1.2.3 *Evaluation du modèle par imagerie*

Pour valider le modèle emphysemateux par imagerie, dans un premier temps des rats mâles Wistar (entre 200 g et 250 g) instillés avec de l'élastase (25 UI/100 g BW) et des rats contrôles instillés avec une solution saline (0,2 mL/animal) ont été évalués. Tous les rats ont d'abord été traités au CERB, et ont ensuite subi des séances d'imagerie : respectivement par IRM 9 semaines post-instillation, ensuite par imagerie micro-tomodensitométrie (CT) au CIPA, et enfin euthanasiés pour réaliser des examens histologiques au CERB environ 12 semaines post-instillation. Ces résultats préliminaires sont présentés en annexe B.

Après validation du protocole pour réaliser le modèle emphysemateux, impliquant une première mise en place par IRM, un lot de rats emphysemateux plus large a été utilisé. Dans ce deuxième cas, des rats femelles (environ 200 g) ont été utilisées : instillés à l'élastase (25 UI/100 g BW) pour former le groupe emphysemateux, et instillés avec une solution saline (0,2 mL/animal) pour le groupe contrôle.

#### 5.1.2.4 *Synthèse des caractéristiques des animaux*

Après la validation du modèle et mise en place des différentes approches d'imagerie, un lot de rats femelles, contenant au total 8 rats traités à l'élastase ( $(272 \pm 18)$  g) et 6 rats contrôles ( $(268 \pm 20)$  g), ont été imagés par IRM 9 semaines post-instillation. Les paramètres correspondants sont résumés dans le tableau ci-dessous (Table 5.3). Les numéros des animaux seront utilisés par la suite.

	<b>Contrôle</b>							
No. Animal	1EC	2EC	3EC	4EC	5EC	6EC		
No. d'étude CERB	1400720	1400718	1400721	1400726	1400724	1400725		
Poids (g)	260	245	290	285	280	245		
	<b>Sensibilisé à l'élastase</b>							
No. Animal	7E	8E	9E	10E	11E	12E	13E	14E
No. d'étude CERB	1400730	1400732	1400729	1400741	1400735	1400727	1400728	1400734
Poids (g)	245	265	295	260	270	285	295	257

Table 5.3. Numéro des rats pour l'étude sur l'emphysème et poids des rats. Les notations EC = Emphysème-Contrôle et E = Emphysème seront utilisées par la suite.

## 5.2 Adaptation du protocole IRM et de l'analyse

Dans cette partie sont présentées les adaptations effectuées par rapport au protocole d'imagerie et au traitement des données présentés aux chapitres précédents pour les rendre compatibles avec l'étude sur les modèles asthmatiques et emphysémateux.

### 5.2.1 Rats asthmatiques

#### 5.2.1.1 Adaptation du protocole d'induction de la crise et d'imagerie

Pour produire la crise d'asthme chez les rats traités à l'OVA, ceux-ci devaient être challengés pendant 20 minutes. Les rats contrôles inhalaient une solution saline pendant la même durée. L'imagerie était ensuite réalisée après 2h, et durait en elle-même environ 2h par rat. Nous avons donc entrelacé le challenge et l'imagerie pour pouvoir réaliser l'imagerie de 3 rats par jour. Les expériences d'imagerie ont été effectuées avec le protocole d'imagerie décrit dans le chapitre 4.1.

#### 5.2.1.2 Amélioration de la segmentation chez les rats asthmatiques

La segmentation avec la méthode basique présentée au chapitre 4.2.1.1 précédent et opérationnelle sur des rats sains s'est avérée moins efficace sur les rats asthmatiques, probablement à cause de signaux moins homogènes dans les poumons. Nous avons identifié à ce stade deux points pour améliorer la segmentation semi-automatique de la région pulmonaire : (i) Une correction de gain pour compenser l'inhomogénéité de champ  $B_1$  à la réception et ainsi affiner les distributions; (ii) un algorithme plus robuste pour ajuster une distribution gaussienne à plusieurs composantes afin de classifier plus facilement les différents niveaux de signal observés en pratique chez les rats asthmatiques.

### 5.2.1.2.1 Correction de la non-uniformité du profil de sensibilité à la réception pour améliorer la segmentation du parenchyme

La correction de la sensibilité d'une antenne de réception peut être effectuée de plusieurs façons. D'abord, on peut utiliser une formule analytique, si celle-ci existe, ce qui est le cas pour une boucle circulaire. Ensuite, puisqu'on se situe dans une approximation quasi-statique des équations de Maxwell, on peut calculer le champ  $B_1$  avec la loi de Biot et Savart. Enfin, on peut mesurer expérimentalement le profil de sensibilité par IRM. Nous avons testé respectivement 3 approches utilisant ces principes et évalué leur influence sur le rétrécissement des distributions de signaux dans les poumons.

1) Une première correction peut être faite en utilisant l'expression théorique du champ magnétique le long de l'axe normal à une antenne circulaire de rayon  $R$  (la position sera notée  $z$  ici). Lorsqu'une boucle circulaire est parcourue par un courant, le champ magnétique est donné par  $B_z = B_{z=0} \times (\cos \alpha)^3$ , où  $\alpha$  est défini comme l'arc-tangente du rapport de  $z$  et  $R$ . Cette méthode approximative est simple ; cependant elle ne fonctionne pas dans tous les cas pour raffiner l'histogramme. Pour être plus précis, un calcul direct basé sur la loi de Biot et Savart est applicable. Ces méthodes directes sont basées sur une approximation de l'antenne utilisée ici par une boucle circulaire et n'ont pas été retenue.

2) Une correction fréquente est de se baser sur une calibration expérimentale par imagerie de la sensibilité de l'antenne. Dans cette idée, nous avons mis en place une correction utilisant une carte de sensibilité acquise sur un fantôme homogène (une bouteille cylindrique contenant de l'eau). L'acquisition a été faite dans les mêmes conditions expérimentales que celles *in vivo* (séquence UTE 3D avec la même taille de voxel). Un algorithme basé sur les gradients conjugués est d'abord appliqué pour lisser la carte de sensibilité acquise et extrapoler la sensibilité en dehors de la zone couverte par le fantôme. Le positionnement de l'antenne fluctuant légèrement entre les expériences, un recalage est ensuite nécessaire au cas par cas sur les données *in vivo*. Cette approche fonctionne correctement et est considéré comme celle la plus robuste parmi les méthodes de correction de gain évaluées. Par contre elle prend initialement plus de temps de calcul pour estimer la carte de sensibilité et nécessite ensuite un recalage d'image pour chaque jeu de donnée.

3) Une correction rapide auto-calibrée utilisant le signal d'un tissu de référence a été développée. A partir d'une segmentation grossière préliminaire des tissus autour du poumon, la sensibilité a été estimée à l'intérieur par un moyennage du signal et ensuite utilisée comme un filtre de lissage sur le signal pulmonaire. Cette méthode fonctionne correctement pour affiner les distributions et l'histogramme peut alors être modélisée par des gaussiennes avec plusieurs composantes séparables. Chaque composante correspond, comme on le verra plus loin, à des tissus différents dans la région pulmonaire. De plus, cette méthode est peu gourmande en temps de calcul et s'adapte intrinsèquement au jeu de données sans nécessiter de recalage d'image.

#### 5.2.1.2.2 Ajustement de l'histogramme par plusieurs gaussiennes

Les algorithmes d'Espérance-Maximisation (256 - Dempster 1977) forment une classe d'algorithmes qui permettent de trouver le maximum de vraisemblance des paramètres d'un modèle probabiliste. Il peut être utilisé pour estimer les paramètres dans des modèles de mélanges gaussiens. Il comporte respectivement deux étapes, l'évaluation de l'espérance (la valeur moyenne attendue) et la maximisation. Dans un premier temps, l'espérance de la vraisemblance est calculée sur chaque composante des mélanges. Ensuite, le maximum de vraisemblance des paramètres est estimé d'après le résultat de la première étape. Les paramètres trouvés sont utilisés comme point de départ d'une nouvelle phase d'évaluation de l'espérance, et les itérations se poursuivent jusqu'à convergence. Nous avons adapté un algorithme proposé dans (283 - Guoshen 2012) au cas d'un ajustement de l'histogramme à des gaussiennes à plusieurs composantes ( $n > 2$ ).

#### 5.2.1.2.3 Segmentation semi-automatique

En résumé, la méthode de segmentation semi-automatique de la ROI pulmonaire était composée de quatre éléments principaux :

- 1) une correction de gain par la méthode d'estimation rapide ;
- 2) un ajustement de l'histogramme du signal sur la ROI au modèle gaussien à plusieurs composantes par l'algorithme Espérance-Maximisation ;
- 3) un ajustement de l'histogramme du signal sur l'image de référence à deux composantes par l'algorithme Nelder-Mead pour retirer le signal correspondant aux vaisseaux sanguins;
- 4) une segmentation manuelle sur la projection pour retirer les vertèbres et les côtes classées incorrectement.

Pour réaliser le masque pulmonaire en pratique, 3 étapes ont été effectuées. Dans un premier temps, une correction de la sensibilité de champ  $B_1$  par une méthode rapide basée sur le profil de signal des tissus autour des poumons (Figure 5.5). Ensuite, une segmentation combinée avec les 2 méthodes suivantes est effectuée (Figure 5.6) : une segmentation par l'histogramme basé sur l'acquisition au TE long (1,4 ms) après correction de gain (Figure 5.6a) ; une deuxième segmentation sur deux régions haute (vers la tête) et basse (vers les pieds) des poumons (une dizaine de coupes à chaque fois) par l'histogramme du signal restant à traiter (Figure 5.6b). Une vérification de la connectivité du masque obtenu par seuillage permettait de retirer les éléments non connectés comme les côtes (6-connectivité). Enfin, certaines régions contenant de l'os comme les vertèbres et les côtes étaient traitées manuellement sur la projection du masque obtenu (Figure 5.6c).

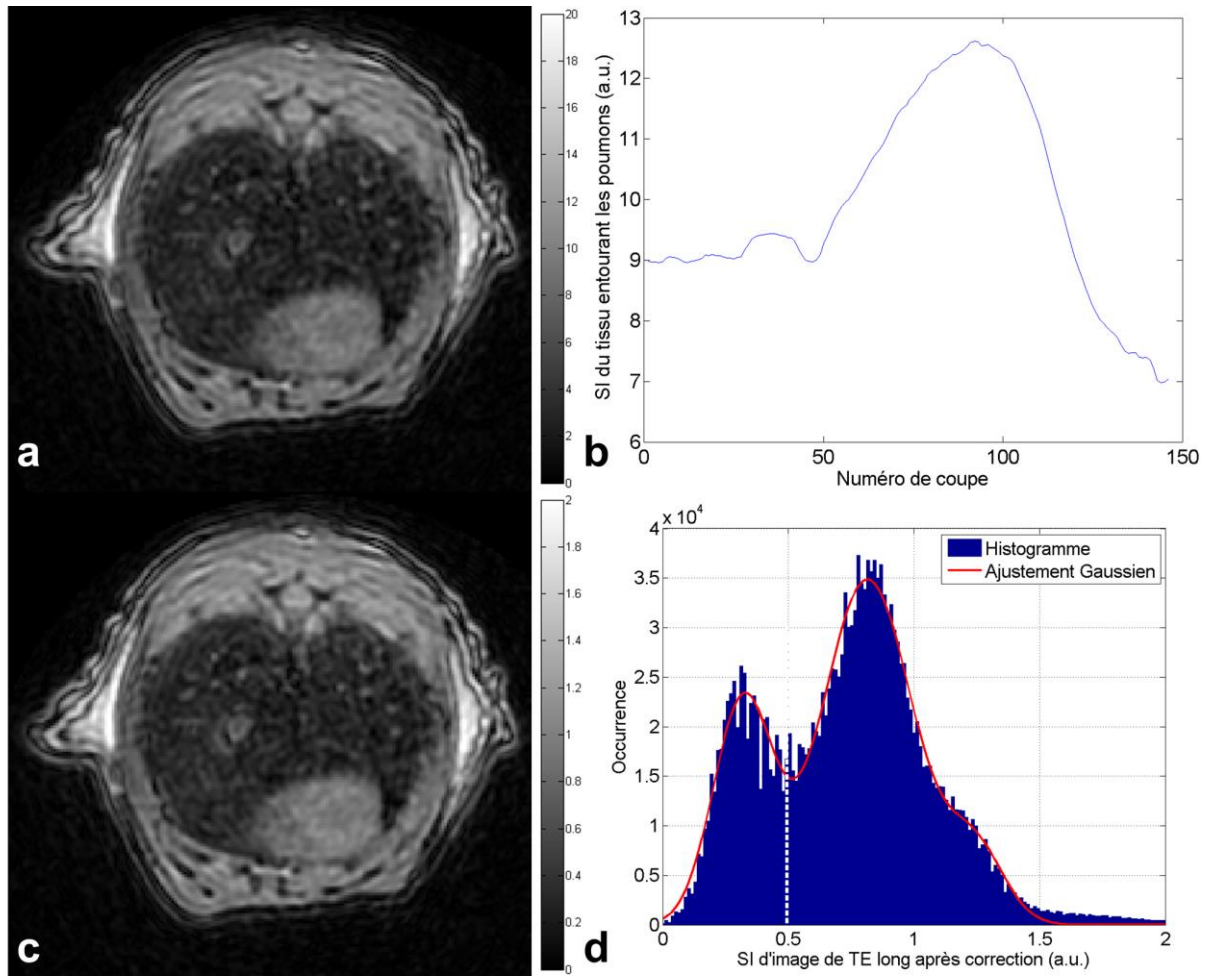


Figure 5.5. L'image ( $TE = 1,4$  ms) d'une coupe représentative avant la correction d'inhomogénéité de champ B1 à la réception (a) montre un profil de signal du tissu entourant les poumons avec une variation importante en fonction de coupe (b). Le SI maximal se trouve dans la région qui se situe au centre de l'antenne de réception. Après la correction, l'image (c) est compensée par la standardisation du profil de signal. L'histogramme est ajusté par la méthode Espérance-Maximation et le seuillage des poumons est déterminée au niveau de la moyenne +  $2 \times SD$  de la première composante de la distribution gaussienne (d ; ligne pointillée).

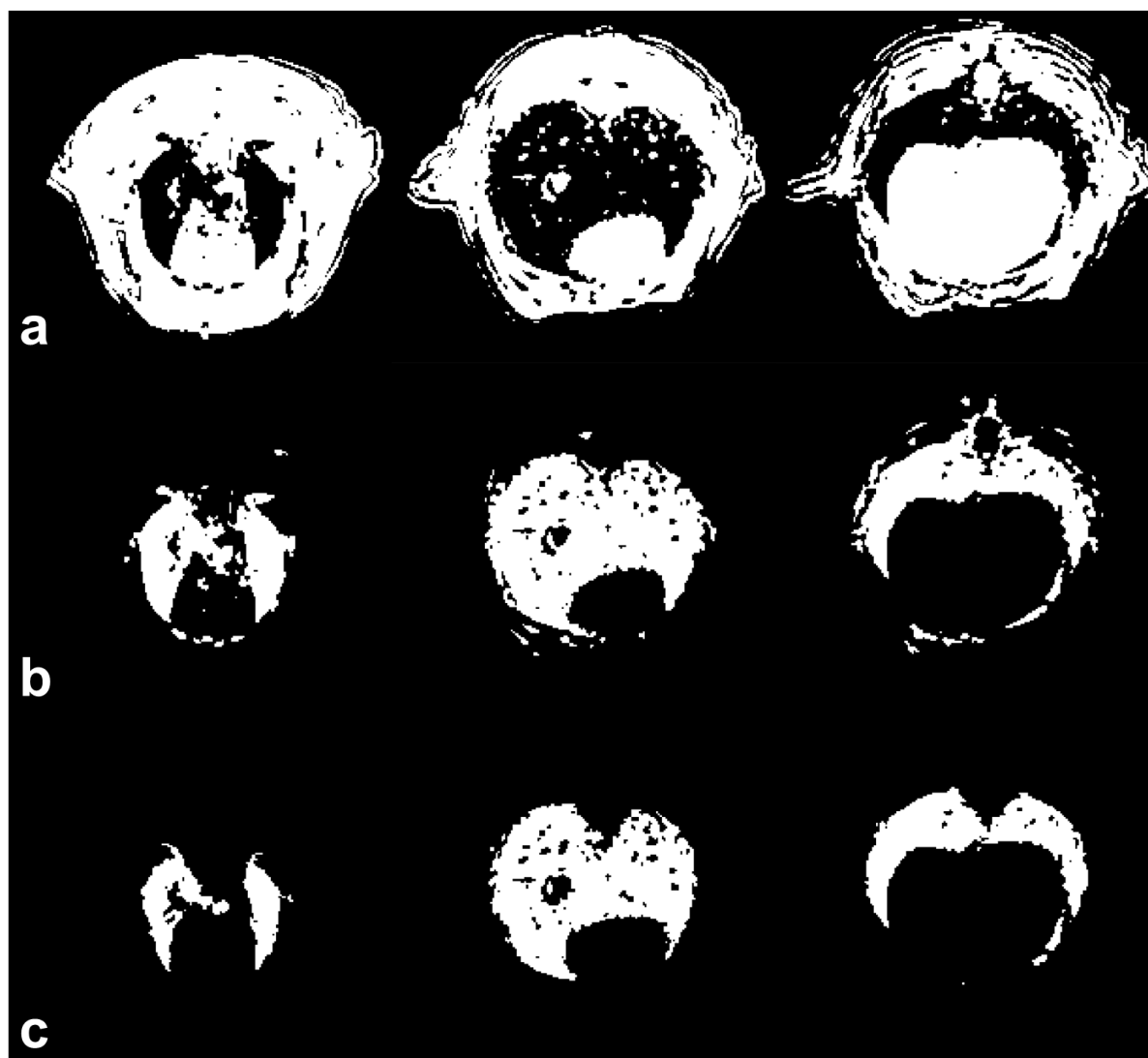


Figure 5.6. Le masque après seuillage de l'histogramme gaussien à 3 composantes (a) montre une première estimation des régions ne correspondant pas aux poumons, respectivement 3 coupes vers la tête, intermédiaire, vers les pieds dans les colonnes de gauche à droite. L'étape suivante extrait le poumon par le traitement sur deux régions haute et basse des poumons par l'histogramme du signal résiduel (b). Enfin, un masque plus fin est déterminé par seuillage basé sur l'analyse de l'histogramme ajusté avec 2 composantes gaussiennes, corrigé manuellement pour retirer les côtes et les vertèbres (c).

### 5.2.1.3 Aspects liés à la quantification des dépôts

Comme l'histogramme de signal post-contraste montrait une distribution gaussienne à plusieurs composantes (une hétérogénéité de distribution), le RSE calculé par la moyenne d'une seule composante gaussienne n'était plus valable pour représenter le rehaussement global des poumons. Par conséquent, les RSE étaient mesurés ici par la moyenne du signal dans la ROI pulmonaire.

La quantité totale du dépôt dans le poumon de rat est évaluée à partir de la carte de concentration reconstruite à partir de rehaussement du signal juste après la fin de nébulisation. Ici,  $T_1$  est considéré

comme étant égal à 1100 ms, la même valeur que mesuré chez des rats sains de 200 g bien que les rats contrôles et asthmatiques soient plus lourds (~300 g). Chen et al. (284 - Chen 1999) a montré que les modifications du poumon dans l'asthme a peu d'effet sur  $T_1$  et que le changement de l'intensité du signal (SI) entre un poumon normal et un poumon avec occlusions des voies aériennes est principalement dû à la densité de protons du parenchyme pulmonaire.

#### 5.2.1.4 *Asymétrie de distribution*

Le coefficient de dissymétrie (en anglais skewness) correspond à une mesure de l'asymétrie de la distribution d'une variable aléatoire réelle. Un coefficient positif indique une distribution décalée à gauche de la médiane, et donc une queue de distribution étalée vers la droite ; et vice versa. Ce coefficient est égal à zéro si la distribution est symétrique. En pratique, il y a plusieurs définitions pour le calculer ; nous présentons une des plus fréquemment utilisées.

Etant donnée une variable aléatoire réelle  $X$  définie sur l'espace de probabilité  $\Omega$ , d'espérance  $\mu$  et d'écart-type  $\sigma$ , un coefficient d'asymétrie peut être défini comme le moment d'ordre trois de la variable centrée réduite (285 - Dodge 2008), nommé «Pearson's moment coefficient of skewness» en anglais :

$$\gamma_1 = \mathbb{E} \left[ \left( \frac{X - \mu}{\sigma} \right)^3 \right] = \frac{\mu_3}{\sigma^3}. \quad (5.3)$$

$\mathbb{E}$  est l'opérateur de l'espérance défini comme  $\mathbb{E}[X] = \int_{\Omega} X dP_X(x)$  avec  $P_X$  la fonction de répartition. Le moment centré d'ordre  $r$  est défini par

$$\mu_r = \mathbb{E}([X - \mathbb{E}(X)]^r) = \int_{\Omega} [x - \mathbb{E}(X)]^r dP_X(x). \quad (5.4)$$

Ce coefficient de dissymétrie sera calculé pour caractériser les distributions de paramètres obtenues chez les rats asthmatiques.

### 5.2.2 *Rat emphysémateux*

#### 5.2.2.1 *Adaptation du protocole d'imagerie*

Pour les rats inclus dans l'étude de reproductibilité (rat 1EC-6EC et 7E-14E), les expériences ont été effectuées avec le même protocole d'imagerie que celui décrit dans le chapitre 4.1.

#### 5.2.2.2 *Adaptation des ROI pulmonaires pour certains rats emphysémateux*

La segmentation a été adaptée pour deux rats emphysémateux traités à l'élastase qui présentaient un signal pré-contraste plus faible. Dans l'étape de segmentation basée sur l'histogramme des images au

TE long (1,4 ms), le seuil a été appliqué à moyenne + SD, au lieu de moyenne + 2 × SD.

#### 5.2.2.3 *Aspects liés à la quantification des dépôts*

La quantité totale de dépôt dans les poumons a été évaluée à partir de la carte de concentration. Le temps de relaxation longitudinale  $T_1$  n'a pas été remesuré pour l'étude sur les rats emphysémateux. Nous avons gardé une estimation à  $T_1 = 1100$  ms comme mesuré chez les rats sains de ~200 g. Stadler *et al.* (286 - Stadler 2007) a montré que l'emphysème influe sur  $T_1$ . Chez des patients emphysémateux,  $T_1$  est plus court que chez des sujets sains (1007 ms (287 - Stadler 2005) vs 1266 ms (288 - Stadler 2008) moyennés entre l'inspiration et l'expiration). Cet effet est probablement lié à la diminution vasculaire ou à une redistribution de la perfusion dans le parenchyme pulmonaire atteint par l'emphysème. Les valeurs de  $T_1$  restent néanmoins proches, bien que l'hypothèse de  $T_1$  identique conduise probablement en réalité à une légère surestimation des dépôts.

Comme les histogrammes de l'intensité de signal post-contraste montraient une distribution gaussienne asymétrique à plusieurs composantes, les RSE étaient mesurés par la moyenne dans la ROI pulmonaire, et non à partir de l'histogramme comme effectué chez les rats sains. La quantité de dépôt totale dans les poumons de rat était évaluée par la carte de concentration reconstruite à partir du rehaussement du signal juste après la fin de nébulisation.

#### 5.2.2.4 *Durée d'administration*

Le nébuliseur utilisé précédemment lors de l'étude sur rats sains a montré des signes d'usure et des instabilités ce qui nous a conduits à changer le nébuliseur lors des expériences sur les rats emphysémateux. Par conséquent, le débit d'aérosolisation de la solution de Gd-DOTA variait entre les différents nébuliseurs du même modèle. La durée de nébulisation effective pour chaque rat a donc variée (Table 5.8 et Table 5.9) entre 22,5 et 67,5 minutes, avec une moyenne de 41 minutes. Cette durée 3 fois plus longue que celle du protocole de mise en place sur les rats sains (~14 min). Une durée similaire (~45 min) a été observée lors d'une nébulisation hors ligne, ce qui suggère que l'influence du système IRM n'est pas à mettre en cause, mais plutôt les propriétés intrinsèques du nébuliseur, tel que l'obstruction de maille vibratoire.

La variation de la durée de nébulisation influence l'évolution du RSE pendant l'administration et la phase d'élimination, mais est supposée ne pas influencer la dose totale administrée. Par ailleurs, cette variation de la durée de nébulisation a été montré de ne pas influencer significativement la distribution de taille de particules d'aérosol (289 - Conway 2012).

### 5.2.3 **Traitement de données et analyses des résultats**

Les paramètres fonctionnels tels que le volume courant (VC) et le volume pulmonaire ont été estimés par l'approche décrite dans le chapitre 4.2. La fréquence respiratoire a été monitorée tout au long de l'imagerie. Le volume courant était estimé via une séquence 3D ciné synchronisé sur la respiration de



l'animal.

Afin d'évaluer les distributions régionales du dépôt de particules, les poumons étaient divisés en 2 volumes égaux ( $V_1 = V_2$ ) le long de 4 directions anatomiques, gauche/droite, antérieur/postérieur, tête/pied et centrale/périphérique comme montré dans le chapitre 4.2.5. La concentration relative dans chaque région était déterminée.

Les analyses sur les données mesurées permettaient de quantifier les paramètres respiratoires et RMN, respectivement RSE après l'arrêt de l'administration d'aérosol (RSE post), RSE maximal (RSE max), le temps pour atteindre le maximum de rehaussement (TTP, Time-To-Peak), la fréquence respiratoire (RR), le volume pulmonaire estimé ( $V_{ROI}$ ), la concentration moyenne mesurée ( $C_{dépôt}$ ), l'intensité de signal pulmonaire pré- ( $SI_{pré}$ ), et post-contraste ( $SI_{post}$ ), le RSB pulmonaire pré- ( $RSB_{pré}$ ) et post-contraste ( $RSB_{post}$ ), le  $R_2^*$  pré- ( $R_{2^*pré}$ ) et post-contraste ( $R_{2^*post}$ ), le volume pulmonaire estimé par la séquence ciné ( $V_{ciné}$ ), le volume courant (VC) et la limite supérieure de la dose administrée (Dose max).

### **5.3 Résultats sur le modèle asthmatique**

Dans cette partie sont présentés les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus par IRM chez le modèle asthmatique. Une synthèse des données quantitatives est tout d'abord présentée. Nous allons ensuite comparer les résultats en détail dans les sous-parties suivantes respectivement organisées en la présentation de l'intensité de signal, du profil respiratoire, de la mesure de  $R_2^*$ , de la cinétique d'élimination, de la carte de concentration, de la distribution régionale et des effets de l'asthme sur les dépôts d'aérosol.

#### **5.3.1 Synthèse de mesures**

Les résultats quantitatifs sur les rats contrôles et sensibilisés à l'OVA sont synthétisés respectivement dans la Table 5.4 et la Table 5.5. La comparaison est présentée dans les paragraphes suivants.

Rat contrôle			
No. Rat	1AC	2AC	Moyenne $\pm$ SEM
RSE post (%)	93,41	59,71	76,56 $\pm$ 16,85
RSE max (%)	100,64	59,71	80,17 $\pm$ 20,46
TTP (min)	27,08	23,22	25,15 $\pm$ 1,93
RR (/min)	62,00	44,00	53,00 $\pm$ 9,00
V <sub>ROI</sub> (mL)	3,74	4,82	4,28 $\pm$ 0,54
C <sub>dépôt</sub> (mmol/L)	0,24	0,19	0,22 $\pm$ 0,02
SI <sub>pré</sub>	5,71	5,79	5,75 $\pm$ 0,04
SI <sub>post</sub>	9,55	9,38	9,47 $\pm$ 0,08
RSB <sub>pré</sub>	23,96	25,75	24,86 $\pm$ 0,89
RSB <sub>post</sub>	40,83	41,52	41,18 $\pm$ 0,35
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>pré</sub> (s <sup>-1</sup> )		727,70	727,70 $\pm$ 0,70
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>post</sub> (s <sup>-1</sup> )	578,11	660,92	619,51 $\pm$ 41,40
V <sub>cine</sub> (mL)	3,84	4,10	3,97 $\pm$ 0,13
VC (mL)	1,85	1,62	1,73 $\pm$ 0,11
Dose max (μmol)	57,65	35,83	46,74 $\pm$ 10,91

Table 5.4. Données obtenues chez les rats contrôles. R<sub>2</sub><sup>\*</sup> du rat 1AC n'était pas analysable à cause du mouvement lors de l'acquisition des deux temps d'écho pré-contraste.

Rats sensibilisés à l'OVA							
No. Rat	3A	4A	5A	6A	7A	8A	Moyenne $\pm$ SEM
RSE post (%)	28,54	12,50	21,05	23,84	23,88	71,81	21,96 $\pm$ 2,42
RSE max (%)	38,24	33,22	22,61	25,98	29,19	95,16	29,85 $\pm$ 2,50
TTP (min)	53,73	88,30	88,10	11,28	41,72	41,75	54,15 $\pm$ 12,2
RR (/min)	61,00	41,00	47,00	39,00	37,00	52,00	46,17 $\pm$ 3,73
V <sub>ROI</sub> (mL)	4,64	7,34	6,18	5,42	6,48	4,78	5,81 $\pm$ 0,43
C <sub>dépôt</sub> (mmol/L)	0,09	0,07	0,07	0,08	0,09	0,24	0,11 $\pm$ 0,03
SI <sub>pré</sub>	5,83	4,30	4,91	6,10	4,51	5,62	5,21 $\pm$ 0,30
SI <sub>post</sub>	7,50	4,83	5,94	7,55	5,58	9,65	6,84 $\pm$ 0,71
RSB <sub>pré</sub>	25,14	20,53	23,84	27,67	20,01	25,62	23,80 $\pm$ 1,23
RSB <sub>post</sub>	32,18	22,38	28,01	34,09	23,76	43,23	30,61 $\pm$ 3,14
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>pré</sub> (s <sup>-1</sup> )	723,04	813,19	813,20	748,08	732,00	734,07	760,60 $\pm$ 16,95
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>post</sub> (s <sup>-1</sup> )	695,15	610,26	633,77	656,53	804,81	544,32	657,47 $\pm$ 35,93
V <sub>cine</sub> (mL)	3,55	3,60	3,90	3,94		2,82	3,56 $\pm$ 0,45
VC (mL)	1,29	1,58	1,41	1,08		1,30	1,33 $\pm$ 0,18
Dose max (μmol)	39,79	32,72	33,48	21,22		34,05	26,88 $\pm$ 6,77

Table 5.5. Données analysées chez les rats sensibilisés à l'OVA.

### 5.3.2 Intensité de signal

Avant l'administration, l'intensité de signal et le RSB pulmonaires moyennés chez les rats contrôles et chez les rats sensibilisés à l'OVA étaient comparables, respectivement  $5,75 \pm 0,04$  vs.  $5,21 \pm 0,30$  pour le SI et  $24,86 \pm 0,89$  vs.  $23,80 \pm 1,23$  pour le RSB. Le SI dans les poumons des rats contrôles et asthmatiques étaient rehaussé significativement ( $p < 0,05$ ) après l'administration. Comparés aux rats contrôles après l'administration, **les rats asthmatiques avaient une intensité de signal et un RSB correspondant significativement plus faibles**, respectivement  $6,84 \pm 0,71$  vs.  $9,47 \pm 0,08$  avec  $p < 0,05$  et  $30,61 \pm 3,14$  vs.  $41,18 \pm 0,35$  avec  $p < 0,05$ .

### 5.3.3 Profil respiratoire

Les rats sensibilisés à l'OVA avaient un volume pulmonaire plus grand que les rats contrôles, soit  $(5,81 \pm 0,43)$  mL vs.  $(4,28 \pm 0,54)$  mL. Parmi les rats sensibilisés à l'OVA, le rat 4A avait un volume le plus large, jusqu'à 7,34 mL. Les volumes calculés par la séquence ciné chez les rats sensibilisés étaient bien réduits par rapport aux volumes segmentés, ce qui suggère une estimation difficile de volume pulmonaire sur ces rats qui respirent moins régulièrement.

Les rats sensibilisés à l'OVA respiraient avec une **fréquence respiratoire** ( $46 \pm 4$  cycles/min) **comparable** aux rats contrôles ( $53 \pm 9$  cycles/min) **pendant l'administration d'aérosol** sous la même dose d'isoflurane ( $\sim 2\%$ ).

Concernant le volume courant, il est lié à la compliance et à la résistance de voies aériennes. Avec une augmentation de résistance de poumon périphérique présent dans l'asthme, le groupe asthmatique montrait un volume courant  $\sim 25\%$  moins grand, mais pas significativement, que le groupe contrôle ( $1,33$  mL vs.  $1,73$  mL). Par conséquence, une dose maximale administrée aux rats asthmatiques a été estimée en moyenne  $\sim 50\%$  plus faible.

### 5.3.4 Mesure de $R_2^*$

Concernant la moyenne de  $R_2^*$  calculée par la cartographie de  $R_2^*$ , les valeurs étaient comparables entre groupe contrôle et groupe sensibilisé à l'OVA, respectivement  $(727,7 \pm 0,7) \text{ s}^{-1}$  vs.  $(760,60 \pm 16,95) \text{ s}^{-1}$  pré-contraste, et  $(619,51 \pm 41,40) \text{ s}^{-1}$  vs.  $(657,47 \pm 35,93) \text{ s}^{-1}$  à 2 heures post-contraste. Cela suggère que **l'effet de susceptibilité air-tissu n'était pas affecté significativement par la bronchoconstriction dans le cas d'asthme**. Nous avons observé **une réduction de  $R_2^*$  après l'administration d'aérosol dans les deux groupes** de rats, sauf pour le rat 7A pour lequel une augmentation de  $732 \text{ s}^{-1}$  à  $805 \text{ s}^{-1}$  a été mesuré.

### 5.3.5 Evolution de la cinétique de prise et d'élimination de contraste

#### 5.3.5.1 Rats contrôles

Les évolutions des **cinétiques de prise de contraste chez les rats contrôles** (Figure 5.7) **sont similaires à celles obtenues pour le groupe de rats sains** (chapitre 4.3.1) : une augmentation rapide pendant l'administration de l'aérosol, suivie par une décroissance progressive après l'arrêt de l'administration. Leurs RSE étaient  $(100,64 \pm 0,17)\%$  et  $(59,71 \pm 0,11)\%$ , en moyenne  $(80,17 \pm 20,46)\%$  plus élevés que la moyenne obtenue sur le groupe de rats sains  $(50 \pm 5)\%$ .

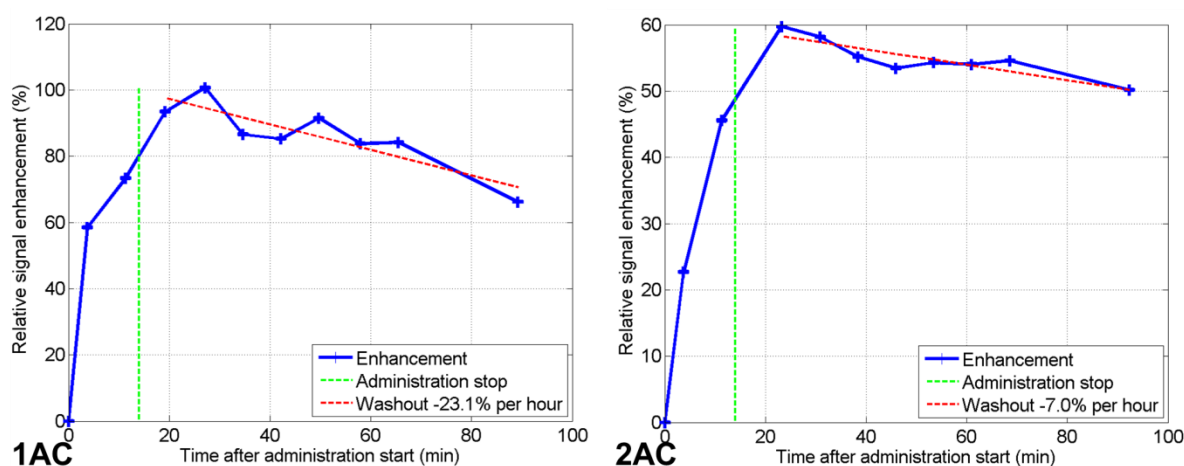


Figure 5.7. Evolution de la cinétique de prise et d'élimination de contraste chez les rats contrôles (rat 1AC et 2AC). Les RSE mesurés par l'histogramme montraient un rehaussement maximal jusqu'à 101% et 60% respectivement pour les deux rats. La tendance est similaire à celle déjà obtenue dans le groupe de rats sains du chapitre 4.3.1.

#### 5.3.5.2 Rats sensibilisés à l'OVA

Comparés aux résultats chez les rats contrôles, l'évolution de **la cinétique de prise de contraste et d'élimination chez les rats asthmatiques se révèle avoir des différences notables**. La forme de courbe est différente et bien plus variable entre les animaux, suggérant des effets de redistribution, peut-être à cause du rétrécissement des voies respiratoires (Figure 5.8). En moyenne, **le RSE après l'administration et le RSE maximal chez des rats sensibilisés à l'OVA étaient beaucoup plus faibles** que ceux chez les rats contrôles, respectivement  $(30,27 \pm 8,59)\%$  vs.  $(76,56 \pm 16,85)\%$  et  $(40,73 \pm 11,11)\%$  vs.  $(80,17 \pm 20,46)\%$ .

Dans le groupe de rats sensibilisé à l'OVA, le rat 8A (Figure 5.8.8A) montrait une cinétique bien distinguable des autres rats 3A-7A (Figure 5.8.3A-7A), avec un RSE post-contraste (après l'arrêt de l'administration) et RSE maximal beaucoup plus élevé. Par rapport aux autres rats asthmatiques, le rat 8A avait un RSE post-contraste  $(71,81 \pm 0,17)\%$  vs.  $(21,96 \pm 2,4)\%$  et un RSE maximal  $(95,16 \pm 0,25)\%$  vs.  $(29,85 \pm 2,50)\%$ .

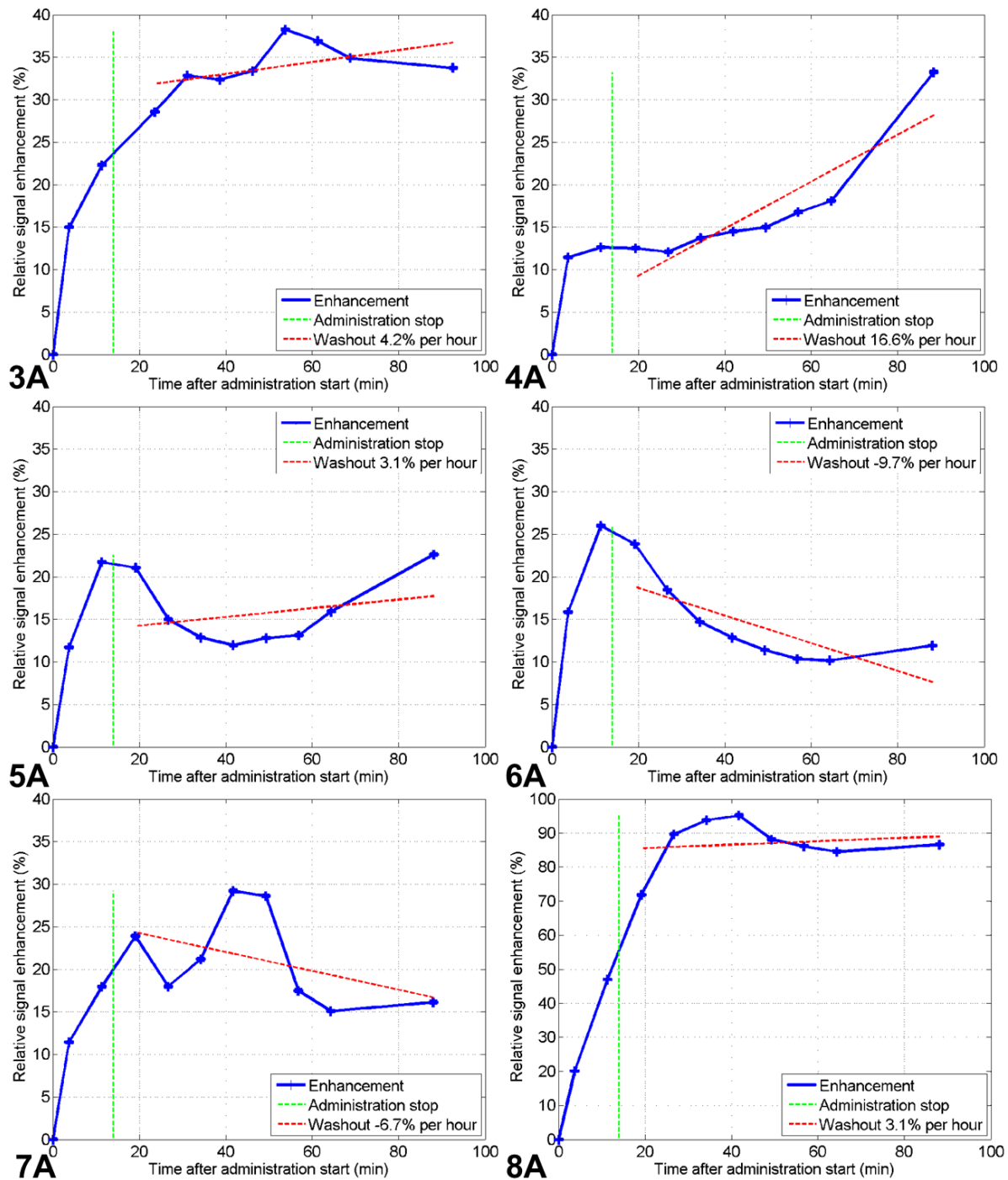


Figure 5.8. Evolution de la cinétique de prise et d'élimination de contraste pour les 6 rats asthmatiques (rat 3A-8A). Les tendances inter-sujets présentaient une variabilité importante, cependant une redistribution de dépôt d'aérosol observée à la fin de protocole d'imagerie (à partir de 60 min) était observable chez les rats 4A-8A (b-f).

### 5.3.6 Carte de concentration des dépôts

#### 5.3.6.1 Rats contrôles

Une concentration moyenne des dépôts d'aérosol de  $(0,22 \pm 0,02)$  mM a été mesurée dans les poumons des rats contrôles après l'arrêt de l'administration (Figure 5.9). Le contraste dans les **poumons de rats contrôles était rehaussé significativement et uniformément** (Figure 5.9.1AC.a-b & 2AC.a-b). Ces observations correspondaient à celles faites chez des rats sains au chapitre 4.3.1.

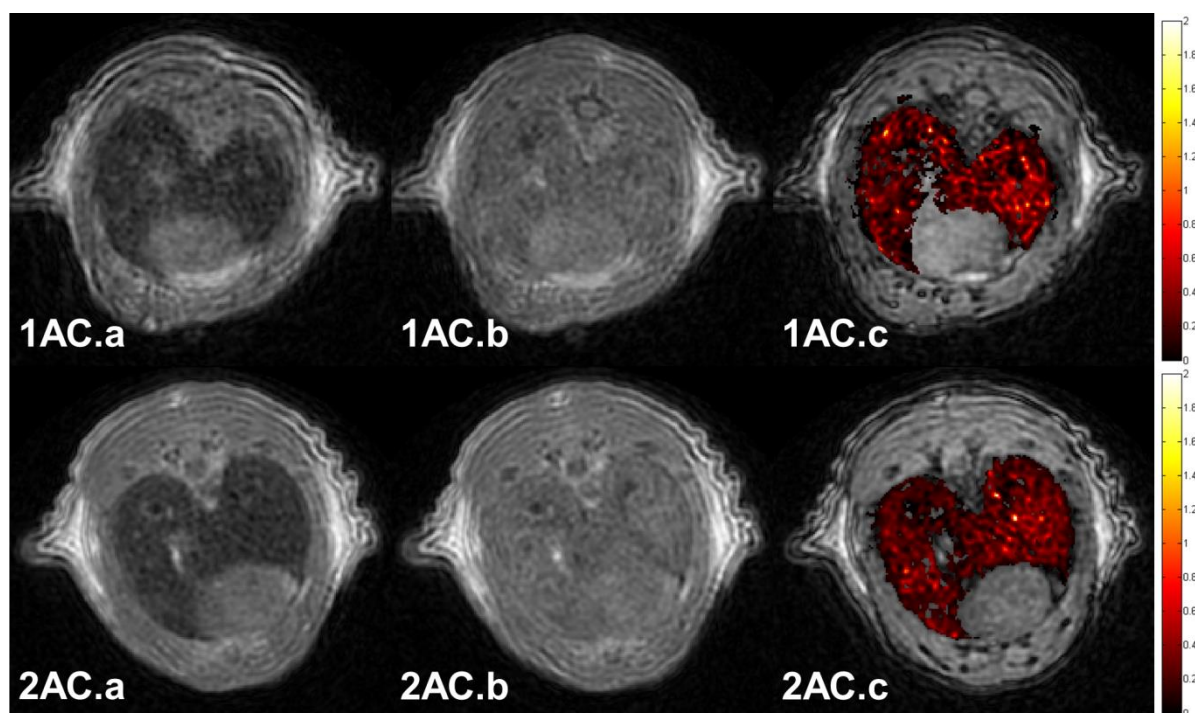


Figure 5.9. Pré- (a), post-administration (à la fin de la nébulisation b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats contrôles (1AC-2AC). La barre de concentration est de 0 à 2 mmol/L. Le SI est rehaussé d'une manière homogène et significative dans les poumons après l'administration de l'aérosol.

#### 5.3.6.2 Rats sensibilisés à l'OVA

Les rats sensibilisés à l'OVA (Figure 5.10 et Figure 5.11) avaient une **concentration moyenne** de dépôt de  $(0,11 \pm 0,03)$  mM, **deux fois moins que celle obtenue chez les rats contrôles**. Parmi les rats asthmatiques, le rat 8A avait une concentration 3 fois plus élevée que les autres (rat 3A-7A), soit 0,24 mM vs. 0,08 mM. Cette concentration plus élevée, correspondant au RSE le plus important obtenu dans le groupe traité à l'OVA, était donc comparable à la concentration mesurée dans les poumons des rats contrôles (0,22 mM).

Concernant les rats sensibilisés à l'OVA, la **distribution hétérogène du dépôt d'aérosol dans les poumons était remarquable** (Figure 5.10.4A.c-5A.c, Figure 5.11.6A.c-7A.c). En particulier, la carte de concentration d'aérosol du rat 3A montrait ainsi une distribution relativement homogène, cependant

un dépôt beaucoup plus faible. Le rat 3A avait également l'index de résistance de voie aérienne le plus faible ( $PenH = 1,06$ ) parmi les rats asthmatiques indiquant une atteinte limitée. Nous avons observés chez les rats 7A et 8A (Figure 5.10Figure 5.11.7A & 8A), des **dépôts localisés avec une densité de dépôt de particules beaucoup plus élevée dans les régions apicales ou intermédiaires**. Ces zones localisées ont des comportements différents que ce que nous avons observés chez les rats sains : un dépôt de particules avec une concentration extrêmement importante s'étend ici quasiment dans les lobes apical et intermédiaire entiers, au lieu d'être présent sous forme de tache limitée comme c'était le cas pour les rats sains.

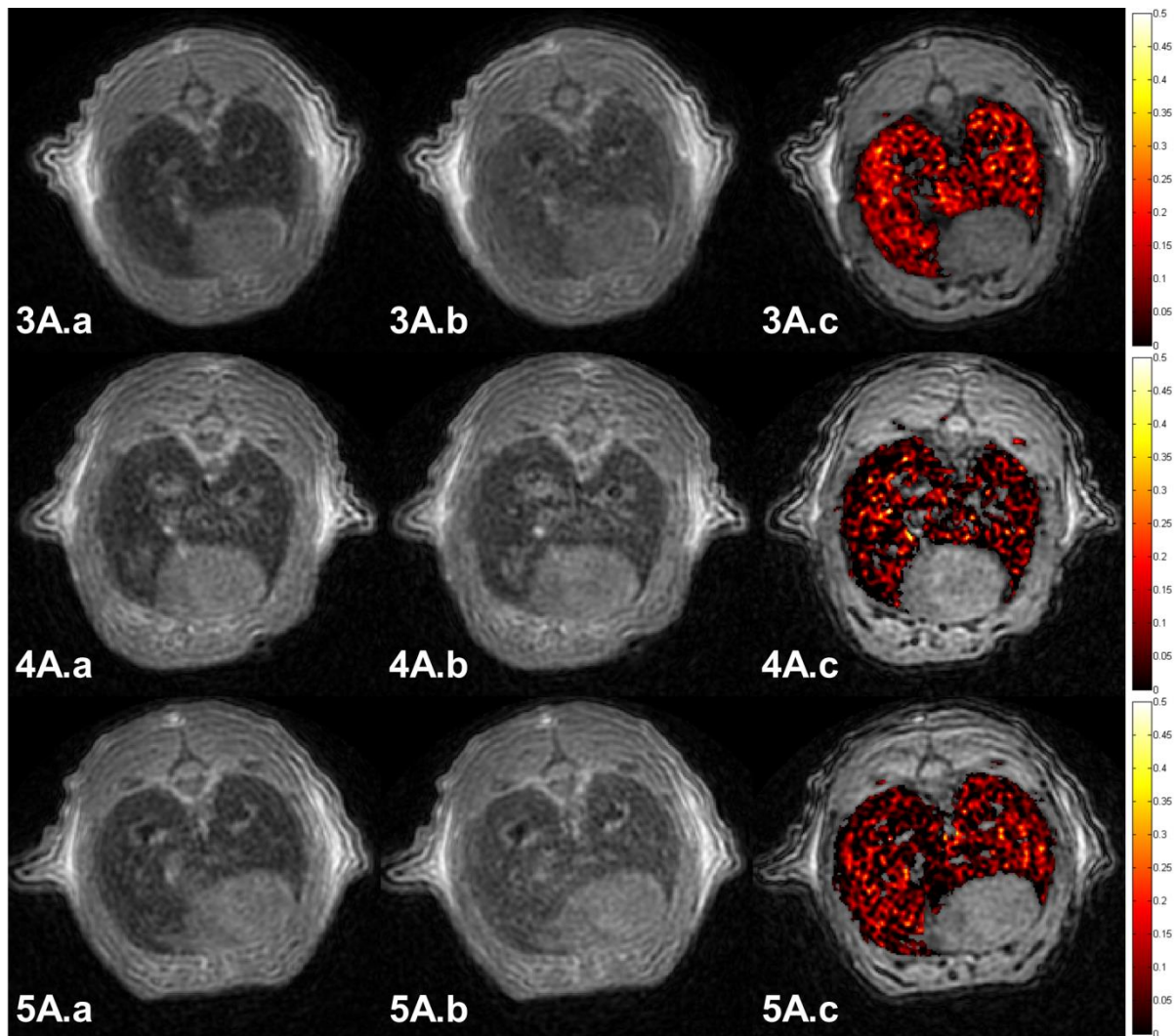


Figure 5.10. Pré- (a), post- administration (à la fin de la nébulisation, b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats sensibilisés à l'OVA (3A-5A). La barre de concentration est de 0 à 0,5 mmol/L. Le SI est rehaussé d'une manière hétérogène et plus faible dans les poumons après l'administration de l'aérosol, en comparaison aux rats contrôles.



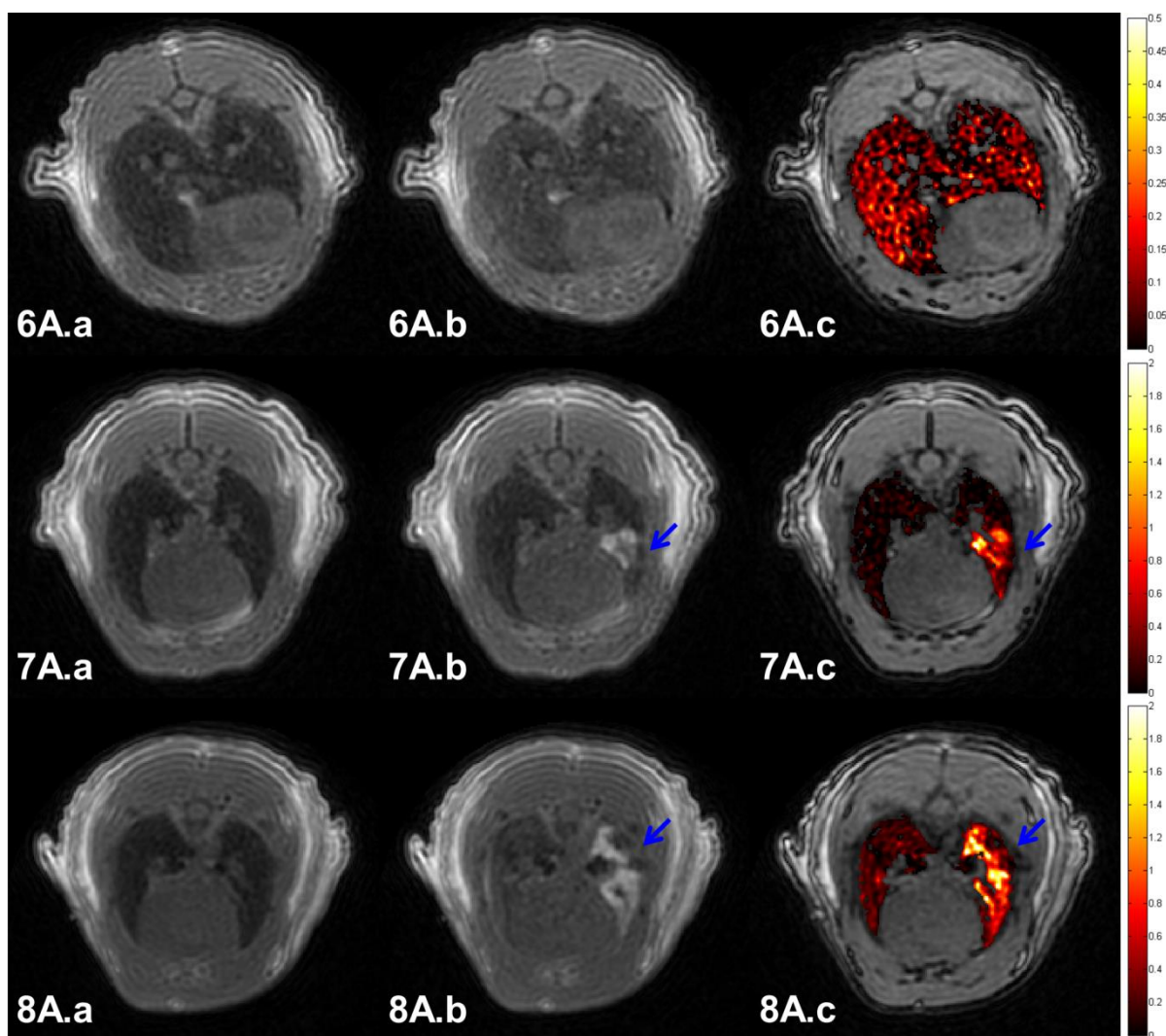


Figure 5.11. Pré- (a), post- administration (à la fin de la nébulisation, b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats sensibilisés à l'OVA (6A-8A). La barre de concentration est de 0 à 0,5 mmol/L pour rat 6A et de 0 à 2 mmol/L pour rat 7A-8A. Le SI est rehaussé d'une manière hétérogène et plus faible dans les poumons après l'administration de l'aérosol, en comparaison aux rats contrôles. Des dépôts localisés et très importants sont observables.

### 5.3.7 Distribution régionale

Chez les **rats contrôles**, une **hétérogénéité du dépôt n'a été observée que dans la direction pied vs. tête** ( $(46,78 \pm 1,75)\%$  vs.  $(53,22 \pm 1,75)\%$ ), mais des **distributions homogènes** ( $\sim 50\%$ ) **dans les trois autres directions**, respectivement gauche vs. droite ( $(50,71 \pm 2,48)\%$  vs.  $(49,29 \pm 2,48)\%$ ), antérieure vs. postérieure ( $(49,30 \pm 1,37)\%$  vs.  $50,70 \pm 1,37\%$ ) et centrale vs. périphérique ( $(50,33 \pm 1,82)\%$  vs.  $49,67 \pm 1,82\%$ ) (Figure 5.12, barres bleues). La différence régionale présentait un dépôt 13,76% plus élevé vers la tête.

Pour les **rats sensibilisés à l'OVA**, des **distributions hétérogènes ont été observées dans toutes les directions** (Figure 5.12, barres rouges), respectivement gauche vs. droite ( $(51,84 \pm 1,93)\%$  vs.



( $48,16\% \pm 1,93\%$ ), antérieure vs, postérieure (( $54,13 \pm 3,24\%$ ) vs, ( $45,87 \pm 3,24\%$ )), pied vs, tête (( $43,10 \pm 4,65\%$ ) vs, ( $56,90 \pm 4,65\%$ )) et centrale vs, périphérique (( $43,33 \pm 2,15\%$ ) vs, ( $56,67 \pm 2,15\%$ )).

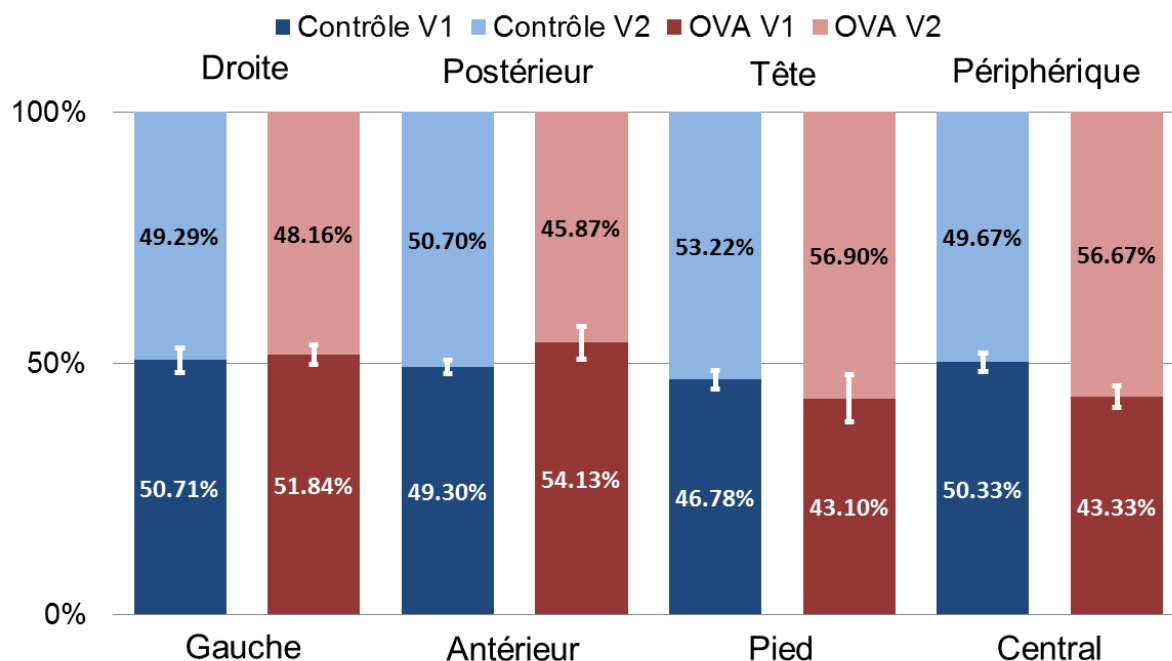


Figure 5.12. Hétérogénéité du dépôt observée dans la direction Tête/Pied pour les rats contrôles et dans toutes les directions pour les rats asthmatiques.

### 5.3.8 Effets de l'asthme sur les dépôts d'aérosol

#### 5.3.8.1 Distribution de l'intensité du signal après l'administration

Sur l'histogramme de l'intensité de signal (SI) après l'arrêt de l'administration, nous avons observé que les SI post-contraste chez les rats contrôles présentaient une forme proche d'une gaussienne à une composante unique (Figure 5.13). En revanche, les SI post-contraste chez les rats sensibilisés à l'OVA ne pouvaient pas toujours être ajustés à une distribution gaussienne à une seule composante (Figure 5.14). Ces observations concordent à celles faites sur les cartes de concentration : une **distribution de dépôt d'aérosol hétérogène dans les poumons de rats sensibilisés à l'OVA et une distribution homogène chez les rats contrôles.**

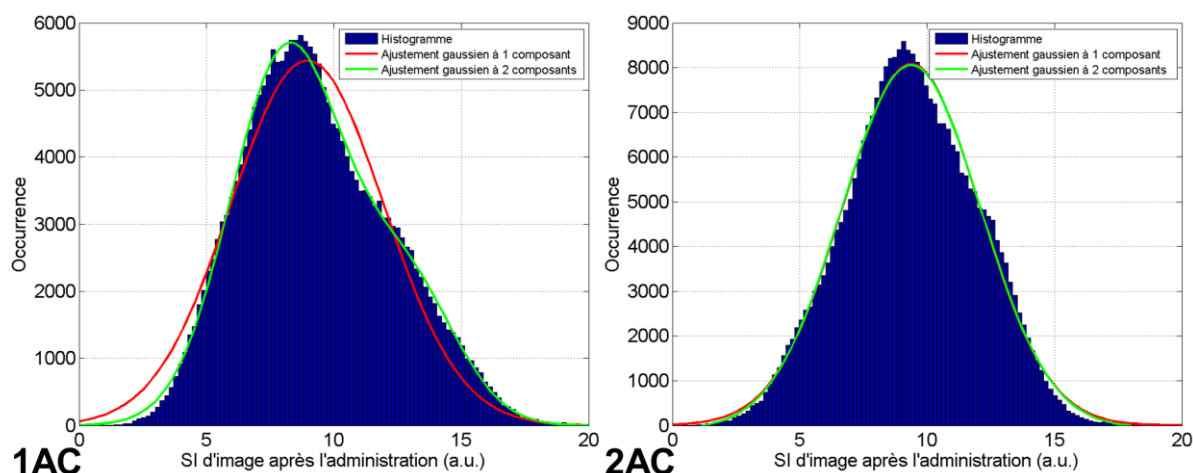


Figure 5.13. L'histogramme de SI après l'administration chez les rats contrôles. L'ajustement était effectué par la distribution gaussienne à un (rouge) et deux (vert) composantes. Les rats contrôles présentaient une distribution de SI qui peut être quasiment ajustée avec une seule composante.

Par conséquent, **l'histogramme du SI post-contraste pourrait rapidement faire état de l'hétérogénéité des dépôts d'aérosol dans les poumons**. Ces histogrammes ajustés à l'aide de deux ajustements, respectivement à une composante (courbe rouge) ou à deux composantes (courbe verte). En particulier, parmi les rats sensibilisés à l'OVA, les rats 3A et 6A (Figure 5.14.3A & 6A) présentent une distribution gaussienne standard, et correspondent à l'index de résistance de voie aérienne le plus faible ( $\text{PenH} = 1,06$  pour rat 3A et  $\text{PenH} = 1,30$  pour rat 6A).

L'hétérogénéité de la distribution de différents paramètres, comprenant le SI post-contraste, pourrait davantage être étudié pour fournir des éléments quantitatifs sur l'hétérogénéité des dépôts. Parmi les estimations quantitatives, la dispersion relative (RD) et l'asymétrie (skewness) seront être présentées dans les parties suivantes 5.3.8.2 et 5.3.8.3.

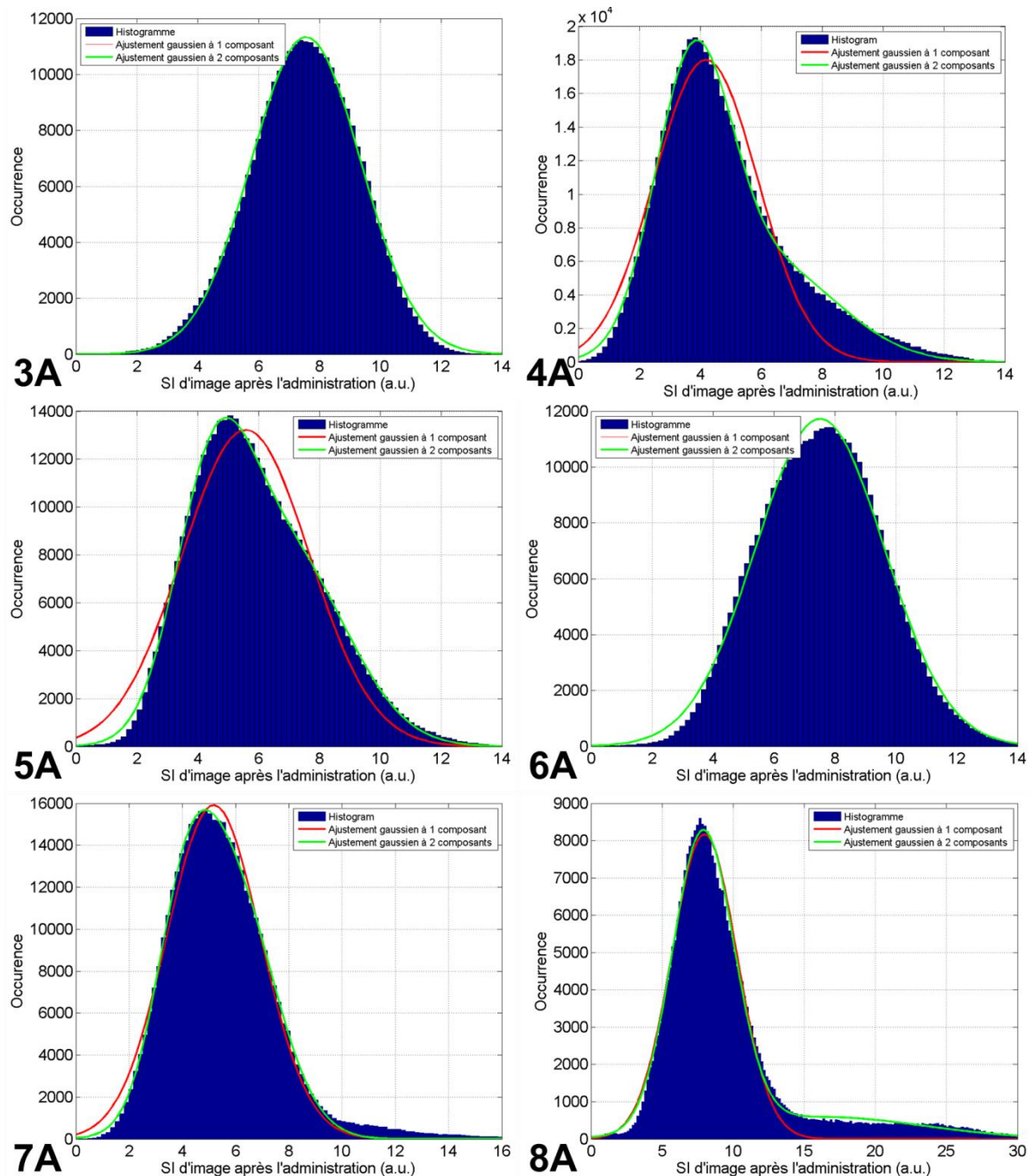


Figure 5.14. L'histogramme de SI après l'administration chez les rats asthmatiques 3A-8A. L'ajustement a été effectué par une distribution gaussienne à une (rouge) et deux (vert) composantes. Les SI post-contraste chez des rats asthmatiques diffèrent d'une manière importante d'une distribution gaussienne à une seule composante, ce qui suggère une hétérogénéité de dépôt d'aérosol dans les poumons. En particulier, SI chez les rats 3A et 6A qui ont un indicateur PenH plus faible montre une distribution proche d'une gaussienne à une composante.

### 5.3.8.2 Dispersion de la distribution des paramètres RMN

La dispersion relative RD est une façon d'estimer des distributions. Ce paramètre s'exprime par  $RD = \text{écart-type}/\text{moyenne}$ . Dans la Table 5.6, les RD de différents paramètres acquis par IRM sont

comparés, respectivement la concentration d'aérosol, le SI pré- et post-contraste, ainsi  $R_2^*$  pré- et post-contraste. Un RD calculé à partir de la carte de concentration chez les rats sensibilisés à l'OVA ( $RD = 2,27 \pm 0,84$ ) était 58% plus élevé comparé aux rats contrôles ( $RD = 1,44 \pm 0,62$ ). Quant à SI pré-contraste, la dispersion était comparable entre rats contrôles et sensibilisés à l'OVA ( $0,29 \pm 0,06$  vs.  $0,29 \pm 0,03$ ). Après l'administration d'aérosol, **une augmentation de RD (SI) plus élevée entre pré- et post-contraste chez rats sensibilisés à l'OVA était observée comparée aux rats contrôles**, soit 28% contre 3%. Concernant RD sur la cartographie  $R_2^*$  pré-contraste, le groupe contrôle et celui sensibilisé à l'OVA était similaire ( $\sim 0,53$ ). **Post-contraste,  $R_2^*$  montrait une dispersion plus importante chez les rats traité à l'OVA comparés au rats contrôles** ( $0,64$  vs.  $0,51$ ).

	Contrôle			Traité par OVA						
No. rat	1AC	2AC	moyen $\pm$ SEM	3A	4A	5A	6A	7A	8A	moyen $\pm$ SEM
RD de C	2,06	0,81	<b>1,44<math>\pm</math>0,62</b>	0,79	6,32	0,85	1,65	2,13	1,87	<b>2,27<math>\pm</math>0,84</b>
RD de SI pré	0,35	0,24	0,29 $\pm$ 0,06	0,22	0,43	0,31	0,25	0,31	0,23	0,29 $\pm$ 0,03
RD de SI post	0,32	0,28	0,30 $\pm$ 0,02	0,24	0,45	0,35	0,27	0,41	0,51	0,37 $\pm$ 0,04
RD de $R_2^*$ pré		0,53	0,53	0,51	0,59	0,53	0,46	0,57	0,50	0,53 $\pm$ 0,02
RD de $R_2^*$ post	0,53	0,48	0,51 $\pm$ 0,03	0,46	0,74	0,64	0,52	0,71	0,79	0,64 $\pm$ 0,05

Table 5.6. RD sur la concentration d'aérosol, RD sur l'intensité de signal pré- et post-contraste, et RD sur  $R_2^*$  pré- et post-contraste chez des rats contrôles et sensibilisés à l'OVA.

Enfin, la dispersion **RD sur la concentration était corrélé positivement avec PenH** ( $R^2 = 0,84$ ,  $p < 10^{-4}$ ) (Figure 5.15) dans le groupe de rats asthmatiques suggérant que **ce paramètre peut être un marqueur de l'asthme**.

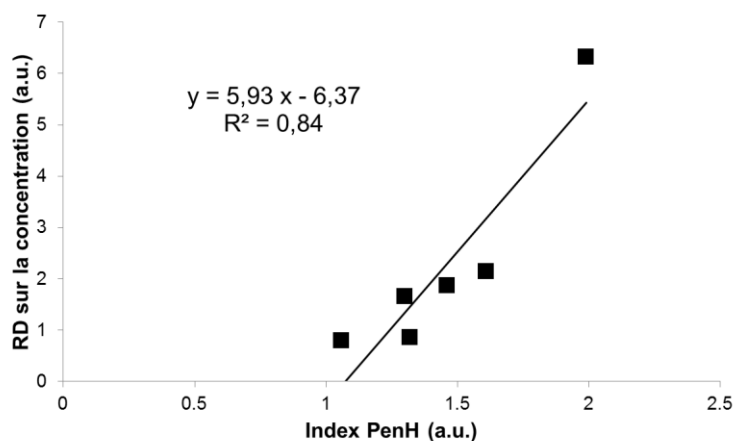


Figure 5.15. Corrélation positive observée entre la dispersion RD sur la concentration et PenH dans le groupe asthmatique. Une résistance des voies aériennes plus élevée (PenH élevé) est liée à une dispersion de concentration plus importante.

### 5.3.8.3 Asymétrie de la distribution des paramètres RMN

Appliqués aux histogrammes présentés dans le chapitre 5.3.8.1, les coefficients d'asymétrie de

l'intensité de signal post-contraste caractérisaient bien la tendance de dissymétrie d'une distribution. **Une différence significative entre rats contrôles et rats sensibilisés à l'OVA a été observé sur le coefficient de dissymétrie de SI post-contraste** ( $p < 0,05$  ; unilatéral), indiquant à nouveau des dépôts hétérogènes dans le cas de l'asthme.

	Contrôle			Sensibilisé à l'OVA						
No. rat	1AC	2AC	moyenne $\pm$ SEM	3A	4A	5A	6A	7A	8A	moyen $\pm$ SEM
C	101,12	57,69	79,40 $\pm$ 21,72	16,62	99,57	6,86	258,28	173,73	58,59	102,28 $\pm$ 39,92
SI pré	0,76	-0,19	0,47 $\pm$ 0,28	-0,22	0,89	0,01	-0,13	-0,03	-0,40	0,28 $\pm$ 0,14
SI post	0,34	0,01	<b>0,17<math>\pm</math>0,17</b>	-0,14	0,96	0,55	0,11	2,42	2,01	<b>1,03<math>\pm</math>0,40</b>
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> pre	1,08	1,18	1,13 $\pm$ 0,05	1,26	0,93	1,18	1,41	1,29	1,18	1,21 $\pm$ 0,06
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> post	1,89	1,62	1,76 $\pm$ 0,14	1,54	1,09	1,36	1,46	0,93	1,22	1,27 $\pm$ 0,09

Table 5.7. Coefficients d'asymétrie de distribution sur différents paramètres RMN dans les deux groupes de rats contrôles et de rats sensibilisé à l'OVA. Les moyennes et les SEM ont été calculées sur les valeurs absolues de coefficient d'asymétrie, pour montrer la tendance de dissymétrie d'un groupe (avec la valeur absolue très supérieure à 0). Ici, l'asymétrie de concentration sur C prend des valeurs largement supérieures à 1, ce qui peut être lié à l'écart-type important par rapport à la moyenne lors du calcul de l'asymétrie.

## 5.4 Discussion sur le modèle asthmatique

Nous discutons ici les causes possibles des effets observés sur les modèles asthmatiques et les mettons en regard d'études précédentes. Les parties sont organisées respectivement sur l'intensité de signal, le profil respiratoire et l'effet de variation de R<sub>2</sub><sup>\*</sup>, l'évolution de la cinétique, la carte de concentration, la distribution régionale, la dispersion et l'asymétrie des distributions. Enfin, une discussion sur la relation entre la modification morpho-pathologique des poumons et le dépôt d'aérosol est proposée.

### 5.4.1 Intensité de signal, profil respiratoire et effet R<sub>2</sub><sup>\*</sup>

Le rétrécissement des voies respiratoires généré par la crise d'asthme n'a pas influencé de manière significative le niveau de signal provenant du parenchyme pulmonaire ni la fréquence respiratoire. L'effet de réduction systématique de R<sub>2</sub><sup>\*</sup> entre pré- et post-contraste observé chez le modèle asthmatique avait été également noté dans le groupe de rat sain. L'effet de compensation de susceptibilité après une administration d'agent paramagnétique se confirme donc.

### 5.4.2 Evolution de la cinétique de prise de contraste

Un RSE chez les rats contrôles ((80,17  $\pm$  20,46)%) plus élevé que celui sur les rats sains de 200 g ((50  $\pm$  5)%) a été observé. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que la taille de voies aériennes du rat de ~300g est généralement plus grande que celle du rat de ~200g. Une augmentation de 15% - 30% sur le diamètre des voies aériennes a été observée entre les rats de souche Sprague-

Dawley de 11 semaines ( $381,4 \pm 13,6$  g) et de 6 semaines ( $150,3 \pm 8,6$  g) par Lee *et al.* (82 - Lee 2011). Cet agrandissement des sections des voies aériennes permet probablement de réduire le filtrage induit sur des particules d'aérosol avec MMAD  $\sim 2,5$   $\mu\text{m}$  et donc d'augmenter l'efficacité d'administration.

Les évolutions de la cinétique des rats sensibilisés à l'OVA montraient des variations importantes au niveau du RSE maximal, de la tendance de la cinétique et de la durée pour atteindre le maximum (TTP). Cette variabilité inter-sujets pourrait être générée par des différences de l'atteinte à l'asthme et l'hétérogénéité de la maladie donnant des symptômes asthmatiques tels que la bronchoconstriction inhomogènes et variables. Cependant une redistribution de particules de Gd-DOTA a été observée systématiquement à la fin du protocole d'imagerie, indiquant un rehaussement identifiable longtemps après l'arrêt de l'administration de l'aérosol. Cet effet peut être dû à un changement de la résistance donc de la morphologie de voie aérienne au cours du temps. En effet, le modèle en lui-même présentait une augmentation progressive lors des premières 120 minutes (de PenH), un effet maximal vers 180 min avant une réduction de la crise d'asthme (Figure 5.4). Par conséquent, la caractérisation de l'élimination par un ajustement de la pente de décroissance après l'arrêt de l'administration serait ici mal adaptée pour caractériser la phase d'élimination et un modèle plus complexe serait nécessaire. L'effet de RSE plus faible chez des rats asthmatiques par rapport à celui mesuré chez les rats contrôles pourrait être un indicateur de l'obstruction des voies aériennes dans la crise d'asthme.

#### **5.4.3 Carte de concentration du dépôt d'aérosol et distribution régionale**

La concentration plus faible observée chez les rats asthmatiques suggère que la bronchoconstriction réduit le dépôt d'aérosol. Alors qu'une distribution de dépôt plutôt hétérogène est obtenue chez les rats asthmatiques, l'homogénéité du dépôt d'aérosol pourrait être un signe d'une atteinte limitée (par exemple, le cas chez le rat 3A). Les régions hyper-intenses observées chez certains rats asthmatiques (rats 7A & 8A) pourraient être le résultat d'une accumulation de particules s'impactant au niveau de la bronchoconstriction (obstruction de voies aériennes), ce qui est probablement la cause d'une concentration de dépôt comparable observée chez le rat 8A par rapport aux rats contrôles.

Pour ce qui est de la distribution régionale, la différence de dépôt entre tête et pied chez les rats contrôles, comme observée précédemment chez les rats sains, pourrait être due à la durée d'administration limitée, à une fréquence respiratoire plus faible pendant l'anesthésie, et à une recirculation de l'aérosol pendant l'expiration. La distribution par demi-volume des rats asthmatiques montrait des hétérogénéités dans toutes les directions, ce qui est potentiellement un effet du rétrécissement de voies aériennes lors de la crise d'asthme.

#### **5.4.4 Dispersion et asymétrie des paramètres RMN**

Entre les rats sensibilisés à l'OVA et les rats contrôles, une RD similaire sur le SI pré-contraste et une augmentation de RD post-contraste plus élevée ont été observés. La RD post-contraste est un effet combiné de la structure pulmonaire et de la distribution hétérogène des dépôts d'aérosol. Comme la

RD pré-contraste est similaire entre les groupes, l'augmentation de RD post-contraste différente entre deux groupes de rats révèle un dépôt de particules avec une distribution plus hétérogène pour l'asthme. Cette hétérogénéité de distribution de dépôt d'aérosol évaluée par RD sur SI post-contraste est en accord avec les résultats obtenus à partir des histogrammes de SI après l'administration (Figure 5.14).

Une différence importante de RD sur la carte de concentration entre rats contrôles et traités a été observée. La dispersion de concentration présentant l'hétérogénéité de distribution d'aérosol dans les rats asthmatiques, corrélée avec la résistance de voie aérienne, suggère qu'elle pourrait être utilisée comme un marqueur physiopathologique pour l'asthme.

Une différence significative entre contrôles et rats sensibilisé à l'OVA a été observé sur l'asymétrie de SI post-contraste. Cela suggère que le coefficient d'asymétrie pourrait être plus rapide pour caractériser la distribution et l'asymétrie, donc l'hétérogénéité des dépôts. C'est un indicateur quantitatif supplémentaire que nous proposons. Par ailleurs, la corrélation obtenue entre le coefficient d'asymétrie du SI pré-contraste et l'index PenH suggère que l'analyse du signal du parenchyme avant même une administration d'aérosol reflète déjà une hétérogénéité du poumon caractéristique du modèle asthmatique.

#### 5.4.5 Modification morpho-pathologique de poumon et dépôt d'aérosol

Le changement structurel induit par le remodelage dans l'asthme contribue à une hyperactivité des voies aériennes et à l'obstruction, parfois irréversible (290 - Bai 2005, 291 - Shifren 2012). (i) Les petites voies aériennes jouent un rôle plus important que les voies aériennes de gros calibre (292 - Lambert 1993). L'hétérogénéité de la bronchoconstriction périphérique, accompagnée par une résistance périphérique augmentée, est un déterminant majeur de l'obstruction de l'air (293 - Lutchen 1997). (ii) La masse de muscles lisses de voie aérienne est considéré comme la cause principale de la hyperactivité (294 - Martin 2000) et la contractilité augmentée dans le cas d'asthme (295 - Mitchell 1994). (iii) La matrice extracellulaire des voies aériennes augmentée, un élément limitant la contractilité, pourrait contribuer à l'obstruction de voie aérienne irréversible par la réduction de distension et à l'inflammation (291 - Shifren 2012). Ces effets physiologiques causés par l'asthme impliquent ensemble le rétrécissement des voies aériennes combiné à la résistance augmentée.

L'index de résistance de voie aérienne, paramètre disponible ici *via* le critère PenH, et qui correspond au paramètre le plus important pour décrire l'asthme, est corrélé à certains paramètres d'imagerie : à l'évolution temporelle de l'aérosol dans les poumons, à la distribution hétérogène de signal pré-contraste et de dépôt et à la concentration moyenne plus faible. Les symptômes asthmatiques comme l'inflammation, l'hypersécrétion muqueuse et le rétrécissement de voie aérienne jouent ensemble pour provoquer une réduction de diamètre des voies aériennes et une augmentation des vitesses du gaz provoquant ainsi de la turbulence (296 - Rottier 2013). Ces effets induisent un dépôt plus important dans les voies aériennes proximales, mais globalement une concentration de dépôt plus faible dans les poumons. Les dépôts préférentiellement dans les voies aériennes plus proximales pour l'asthme pourraient aussi expliquer la cinétique d'élimination différente avec une absorption plus lente dans le

parenchyme pulmonaire. Ces éléments très positifs obtenus avec la technique IRM UTE sur un modèle animal de l'asthme suggèrent que celle-ci est informative pour la caractérisation de modèles asthmatiques, qu'elle peut aider au développement de méthodes d'administration par voie inhalée. Enfin, elle pourrait s'avérer informative dans la caractérisation de la maladie en clinique.

## 5.5 Résultats sur le modèle emphysémateux

De manière similaire au chapitre 5.3, dans cette partie sont présentés les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus par IRM chez le modèle emphysémateux. Une synthèse des données quantitatives est tout d'abord présentée. Nous comparons ensuite ces résultats en détail dans les sous-parties suivantes ; respectivement sur l'intensité de signal, le profil respiratoire, la mesure de  $R_2^*$ , la cinétique d'élimination, la carte de concentration, la distribution régionale et les effets de l'emphysème sur les dépôts d'aérosol.

### 5.5.1 Synthèse des aspects quantitatifs

Les résultats de l'analyse des données sur les rats contrôles et les rats traités à l'élastase sont présentés respectivement dans les Table 5.8 et Table 5.9.

Rats contrôles							
No. Rat	1EC	2EC	3EC	4EC	5EC	6EC	moyenne±SEM
RSE post (%)	74,24	53,15	47,11	39,77	65,81	39,76	53,31±5,77
RSE max (%)	74,24	53,15	47,11	39,95	65,81	39,76	53,34±5,76
Durée d'aérosol (min)	30,00	45,00	45,00	45,00	37,50	37,50	40,00±2,50
TTP (min)	35,28	52,57	43,90	43,52	43,33	34,87	42,24±2,68
RR (/min)	27,00	27,00	33,00	37,00	31,00	40,00	32,50±2,16
$V_{ROI}$ (mL)	3,97	3,97	2,91	2,74	3,34	3,12	3,34±0,22
$C_{dépôt}$ (mmol/L)	0,23	0,17	0,15	0,13	0,21	0,13	0,17±0,02
$SI_{pré}$	7,07	6,30	6,84	8,19	7,23	7,70	7,22±0,27
$SI_{post}$	12,33	9,65	10,06	11,45	11,99	10,76	11,04±0,43
$RSB_{pré}$	29,88	26,51	28,30	30,72	29,15	31,38	29,32±0,72
$RSB_{post}$	50,23	37,85	41,99	40,86	48,19	42,86	43,66±1,90
$R_2^*_{pré}$ ( $s^{-1}$ )	661,76	653,48	546,69	570,28	648,09	612,44	615,46±19,52
$R_2^*_{post}$ ( $s^{-1}$ )	595,66	698,54	532,58	565,81	572,26	556,95	586,97±23,84
$V_{cine}$ (mL)	3,10	3,73	3,37	3,94	4,54		3,74±0,25
VC (mL)	1,56	1,52	1,68	1,80	1,25		1,56±0,09

Table 5.8. Données obtenues chez les rats contrôles. Il est à noter que la dose maximale estimée n'est pas disponible, car la concentration d'aérosol dans la ligne d'entrée n'a pas pu être caractérisée pour la durée de nébulisation variable.



Rats traités à l'élastase									
No. Rat	7E	8E	9E	10E	11E	12E	13E	14E	moyenne±SEM
RSE post (%)	75,86	42,82	76,82	84,21	64,34	50,20	31,08	59,06	60,55±6,50
RSE max (%)	80,26	44,61	76,82	84,21	64,79	57,15	31,08	59,06	62,25±6,47
Durée d'aérosol (min)	37,50	22,50	45,00	37,50	37,50	67,50	45,00	45,00	42,19±4,47
TTP (min)	71,98	41,97	51,87	27,97	66,82	55,02	46,60	36,12	49,79±5,26
RR (/min)	28,00	29,00	45,00	28,00	34,00	29,00	35,00	29,00	32,13±2,07
V <sub>ROI</sub> (mL)	3,38	3,55	2,98	3,26	3,71	3,37	2,75	3,12	3,26±0,11
C <sub>dépôt</sub> (mmol/L)	0,24	0,14	0,24	0,27	0,20	0,15	0,10	0,18	0,19±0,02
SI <sub>pré</sub>	6,73	4,89	7,79	7,23	5,78	7,24	6,66	6,42	6,59±0,32
SI <sub>post</sub>	11,83	6,99	13,77	13,32	9,51	10,87	8,73	10,21	10,65±0,81
RSB <sub>pré</sub>	29,37	22,49	30,97	30,03	24,61	32,94	27,93	25,46	27,98±1,25
RSB <sub>post</sub>	49,14	31,30	54,90	56,82	41,44	44,27	37,15	40,57	44,45±3,09
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>pré</sub> (s <sup>-1</sup> )	677,44	786,70	630,30	546,46	644,63	575,26	576,14	622,72	632,46±26,69
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>post</sub> (s <sup>-1</sup> )	679,52	854,91	509,14	490,98	710,93	562,61	521,52	583,44	614,13±44,32
V <sub>cine</sub> (mL)	2,67	2,96	3,89	2,75	4,27	5,13	4,05		3,67±0,35
VC (mL)	0,75	0,97	1,93	1,34	1,73	2,17	2,16		1,58±0,22

Table 5.9. Données obtenues sur les rats traités à l'élastase.

### 5.5.2 Intensité du signal

Avant l'administration, les rats traités à l'élastase avaient un RSB moyen sur les poumons comparable aux rats contrôles, soit  $27,98 \pm 1,25$  vs.  $29,32 \pm 0,72$ , ainsi qu'une intensité du signal comparable, soit  $6,59 \pm 0,32$  vs.  $7,22 \pm 0,27$ . Entre les rats contrôles et ceux traités à l'élastase, les intensités de signaux (11,04 vs. 10,65, a.u.) et le RSB (43,66 vs. 44,45, a.u.) post-administration étaient comparables malgré la durée d'administration variable pour ces animaux.

### 5.5.3 Profil respiratoire

Les rats traités à l'élastase avaient des volumes pulmonaires comparables à ceux des rats contrôles, soit  $3,34 \pm 0,22$  mL vs.  $3,26 \pm 0,11$  mL. Concernant le profil respiratoire, les rats traités à l'élastase respiration avec une fréquence respiratoire en moyenne ( $32 \pm 2$  cycles/min) comparable à celle des rats contrôles ( $33 \pm 2$  cycles/min) pendant l'administration d'aérosol contrôlé avec une dose similaire d'isoflurane (~ 3%). Concernant le volume courant, la moyenne entre les rats contrôles et traités à l'élastase est comparable, 1,56 mL vs. 1,58 mL. Cependant une variabilité plus importante chez les rats traités à l'élastase a été observée.

### 5.5.4 Mesure de R2\*

Les rats traités à l'élastase montraient un  $R_2^*$  moyen pré-contraste comparable à celui des rats contrôle

$(632,46 \pm 26,69) \text{ s}^{-1}$  vs.  $(615,46 \pm 19,52) \text{ s}^{-1}$ . Après l'administration, une tendance de réduction de  $R_2^*$  était observée dans le groupe de rats contrôles (à part pour le rat 2EC) et ainsi que pour les rats traités à l'élastase (sauf rats 7E, 8E, 11E).

La **variation de  $R_2^*$  entre post- et pré-contraste**, définie comme  $(R_{2,\text{post}}/R_{2,\text{pré}} - 1)\%$ , était **négativement corrélée à l'intensité de signal pré-contraste dans le groupe emphysémateux** ( $R^2 = 0,71$ ,  $p < 10^{-4}$ ) (Figure 5.16), suggérant qu'une compensation plus faible de susceptibilité a été observée dans l'espace aérienne élargi ( $SI_{\text{pré}}$  moins important).

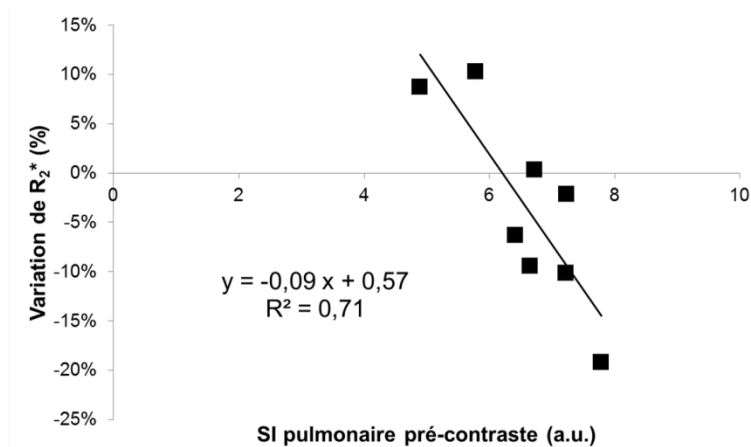


Figure 5.16. Corrélation négative entre l'intensité de signal des poumons pré-contraste et la variation de  $R_2^*$  chez les rats traités à l'élastase.

## 5.5.5 Evolution de la cinétique de prise et d'élimination de contraste

### 5.5.5.1 Rats contrôles

Les évolutions temporelles du signal chez les rats contrôles (Figure 5.17) sont similaires à celles des rats sains : une augmentation relativement rapide pendant l'administration de l'aérosol (bien que celle-ci soit de durée variable), suivie par une décroissance progressive après l'arrêt de l'administration. Leur RSE maximal moyen était de  $(53,34 \pm 5,76)\%$ , comparable à la moyenne obtenue dans le groupe de rats sains  $(50 \pm 5)\%$ . Ces maxima de rehaussement ont été observés peu après l'arrêt de la nébulisation ou lors de l'acquisition correspondant à la fin de la nébulisation.

### 5.5.5.2 Rats traités à l'élastase

Les évolutions de la cinétique des 8 rats traités à l'élastase montraient de variabilités importantes. Ils différaient entre eux aussi bien sur le niveau de RSE maximal que sur la tendance de dynamique et la durée pour atteindre le pic.

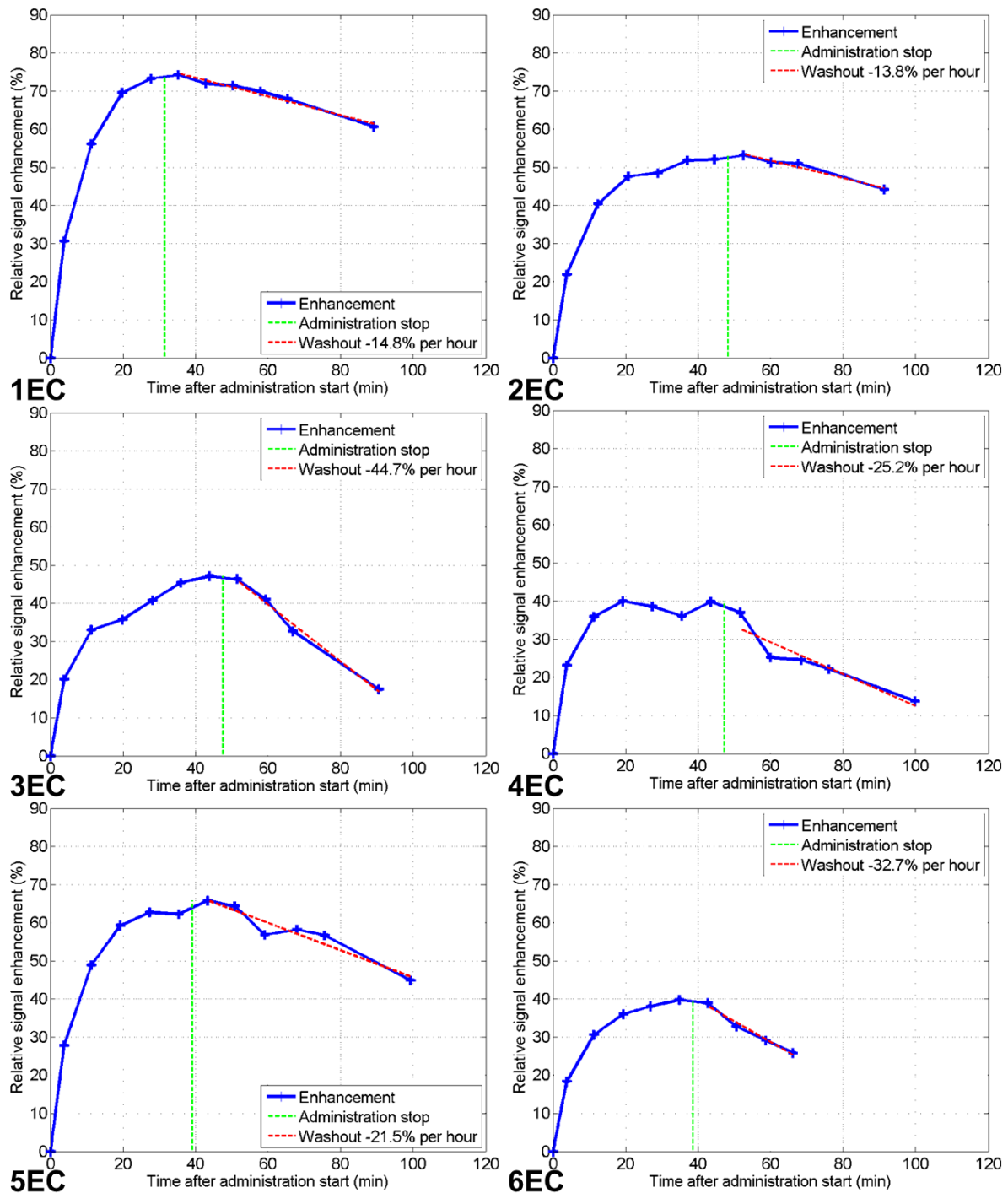


Figure 5.17. Evolution de la cinétique de prise de contraste pour les rats contrôles (rat 1EC-6EC) représentée avec la même échelle de RSE et le temps d'acquisition. Les RSE mesurés à partir de l'histogramme montraient un rehaussement maximal allant jusqu'à  $(53,34 \pm 5,76)\%$  pour ce groupe de rat. Les tendances sont similaires à celles obtenues dans le groupe de rats sains.

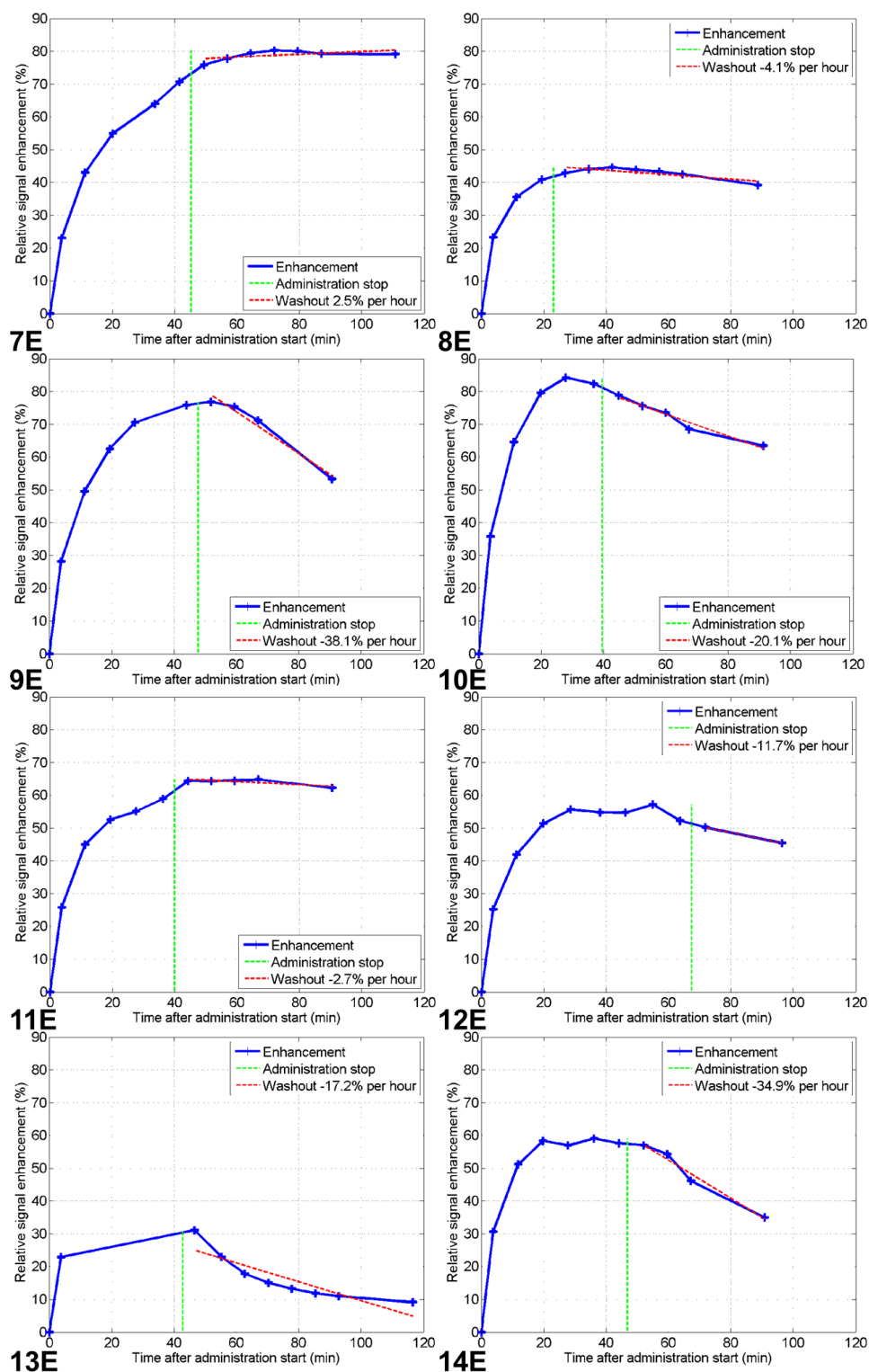


Figure 5.18. Evolution temporelle pour les 8 rats emphysémateux (rat 7E-14E). Les tendances d'évolution présentent des variabilités importantes entre rats. Des RSE maximaux et l'arrêt de l'administration (ligne pointillée verte) avaient un délai de ~30 min après l'arrêt (rats 7E, 8E et 11E), ou de ~10 min avant l'arrêt (rats 10E, 12E et 14E). Par rapport aux rats contrôles, des RSE maximaux ont été observés peu après l'arrêt ou lors de l'acquisition correspondant à la fin de la nébulisation. Par ailleurs, des RSE maximaux plus élevés que pour les rats contrôles ont été observés.

Comme décrit dans la chapitre 5.2.2.4, la durée d'administration variait inter-sujets, et il y avait un animal (rat 13E) qui n'est passé à l'IRM qu'après la fin de l'administration d'aérosol. Nous allons donc analyser la dynamique du rat 13E indépendamment. Le rat 13E (Figure 5.18.13E) présentait une décroissance après l'arrêt de nébulisation et un rehaussement relativement faible ( $31,08 \pm 0,12\%$ ). Mis à part pour ce rat, les tendances des courbes des autres rats ne montraient pas toujours une clairance tout de suite après l'arrêt d'administration : pour 3 rats (rats 7E, 8E et 11E ; Figure 5.18.7E, 8E et 11E), des RSE maximaux arrivent  $\sim 30$  min après la fin de l'administration ; et 3 rats (rat 10E, 12E et 14E ; Figure 5.18.10E, 12E et 14E) présentent des RSE maximaux  $\sim 10$  min avant l'arrêt de l'administration. Ces incohérences entre le rehaussement maximal et le moment d'arrêt d'administration pourraient être liées à l'état pathologique des animaux.

En comparaison avec les rats contrôles, la **moyenne du RSE après l'arrêt de l'administration et le RSE maximal chez les rats traités à l'élastase** (à part rat 13E) étaient **légèrement plus élevés mais pas significativement**, respectivement ( $64,76 \pm 5,35\%$  vs. ( $49,25 \pm 4,54\%$ ) et ( $66,70 \pm 5,07\%$  vs. ( $53,34 \pm 5,76\%$ ).

## 5.5.6 Carte de concentration du dépôt d'aérosol

### 5.5.6.1 *Rats contrôles*

Le rehaussement de contraste dans les régions normales des poumons des rats contrôles était significatif et homogène. Les rats contrôles avaient une concentration moyenne de dépôt de  $0,17 \pm 0,02$   $\mu\text{mol}$  mesurée après l'arrêt de l'administration (Figure 5.19 et Figure 5.20).

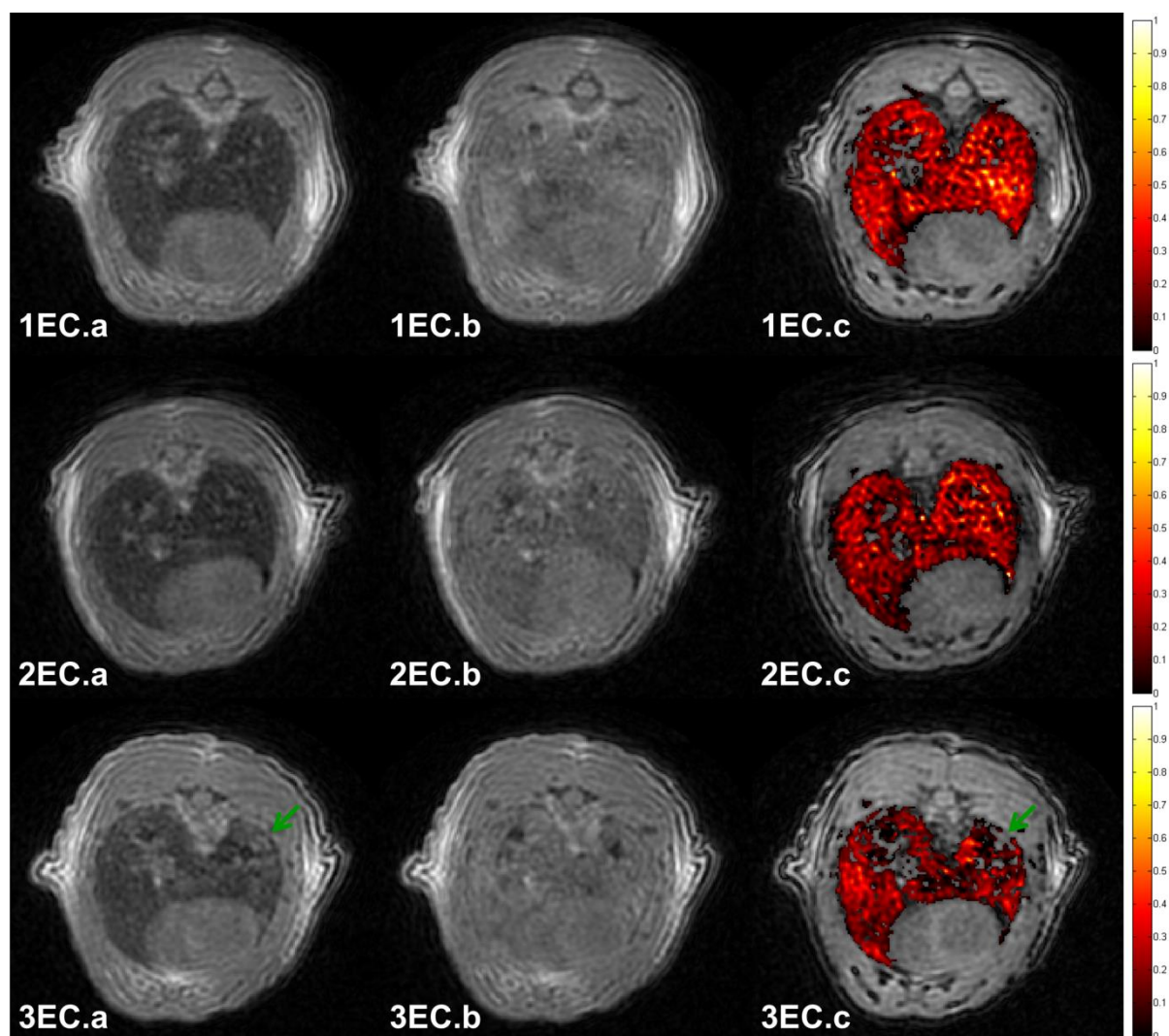


Figure 5.19. Pré- (a), post- administration (à la fin de l'administration, b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats contrôles (rat 1EC-3EC). La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. Le SI était rehaussé d'une manière relativement homogène et significative dans les poumons après l'administration d'aérosol, bien qu'il y ait des structures pulmonaires inhabituelles observées pour le rat 3EC (flèches vertes).

Certaines variabilités étaient remarquables parmi les rats contrôles. En particulier, trois animaux (rats 3EC, 4EC et 6EC) montraient une morphologie pulmonaire inhabituelle. Ils avaient des régions où se trouvaient des hyper-signaux identifiabiles dans les poumons à l'acquisition pré-contraste. Ces effets sont peut-être dus à des défauts du parenchyme dans les lobes apicaux/intermédiaires (Figure 5.19.3EC, Figure 5.20.4EC et Figure 5.20.6EC, indiqués par des flèches vertes). Ces structures inhabituelles produisaient les cartes de concentrations différentes par rapport à l'étude sur rats sains. Chez les mêmes animaux (rats 3EC, 4EC et 6EC), des régions avec une concentration des particules plus importante ont été observées dans les lobes apicaux droits (Figure 5.21, indiquées par des flèches bleues). La densité de dépôt de particules dans ces régions plus intense était en moyenne de  $(0,30 \pm 0,02)$  mM, deux fois plus élevée que celle dans leurs régions dites « normales » qui avaient une concentration de  $(0,14 \pm 0,01)$  mM. Contrairement aux lobes droits où se trouvaient les taches plus intenses, les lobes gauches de ces rats montraient des défauts de structure pulmonaire bien



identifiables, semblant indiquer une atteinte du parenchyme pulmonaire (Figure 5.21).

Pour ce qui est de la concentration de dépôt, les rats possédant des comportements inhabituels dans les poumons (rats 3EC, 4EC et 6EC) avaient des dépôts de  $(136,67 \pm 6,67) \mu\text{M}$ , **~1,5 fois plus faible que les autres rats contrôles** (rats 1EC, 2EC, 5EC)  $(203,33 \pm 17,63) \mu\text{M}$ . Bien que le rat 5EC présente également des défauts dans la région intermédiaire (Figure 5.20.5EC), sa concentration de dépôt de  $208,47 \mu\text{M}$  était similaire aux deux autres rats dits « normaux » de  $201,88 \mu\text{M}$  (rats 1EC, 2EC).

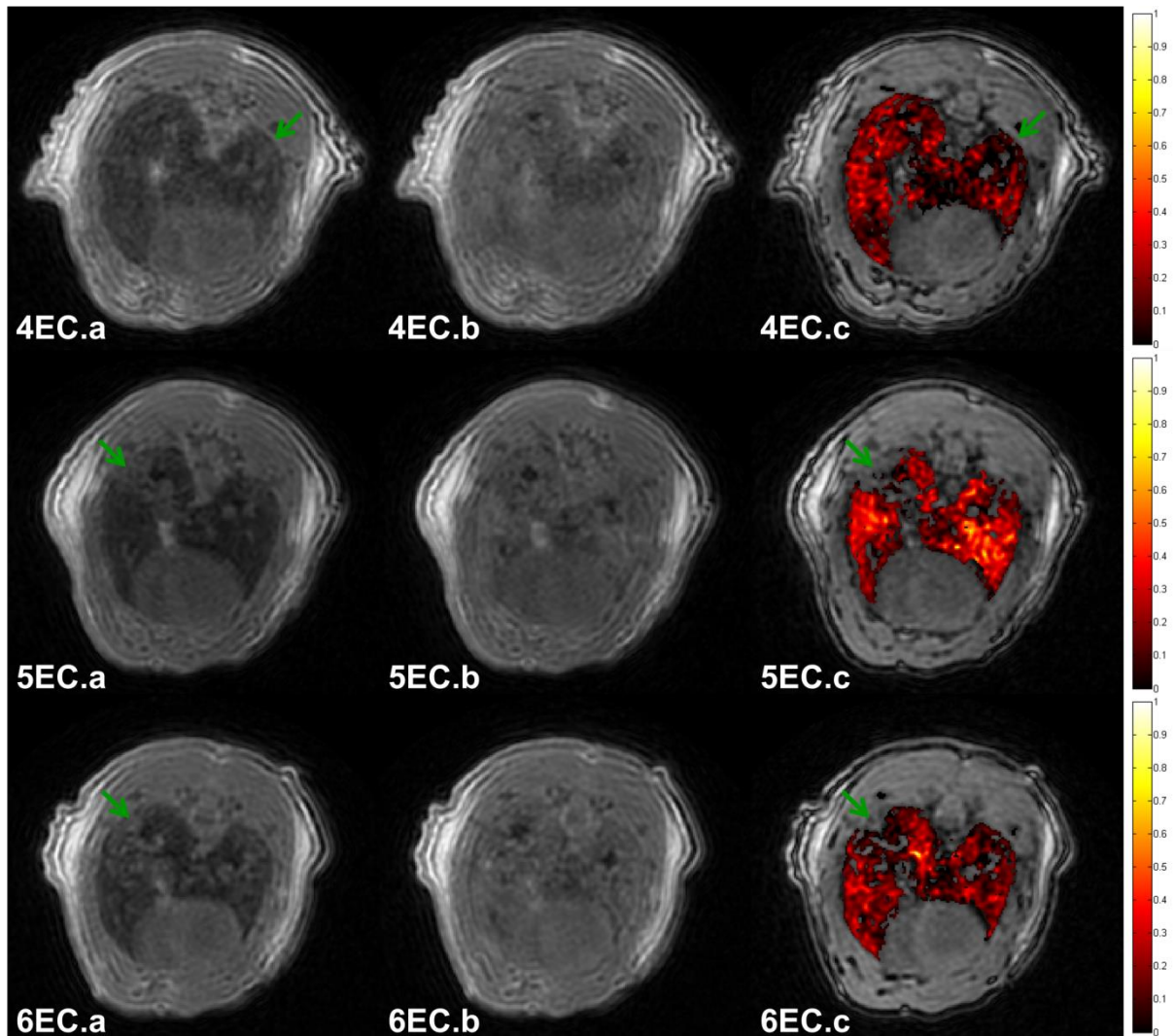


Figure 5.20. Pré- (a), post- administration (à la fin de l'administration, b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats contrôles (4-6). La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. Le SI est rehaussé d'une manière relativement homogène et significative dans les poumons après l'administration de l'aérosol, bien qu'il y ait des structures pulmonaires inhabituelles observées (flèches vertes).

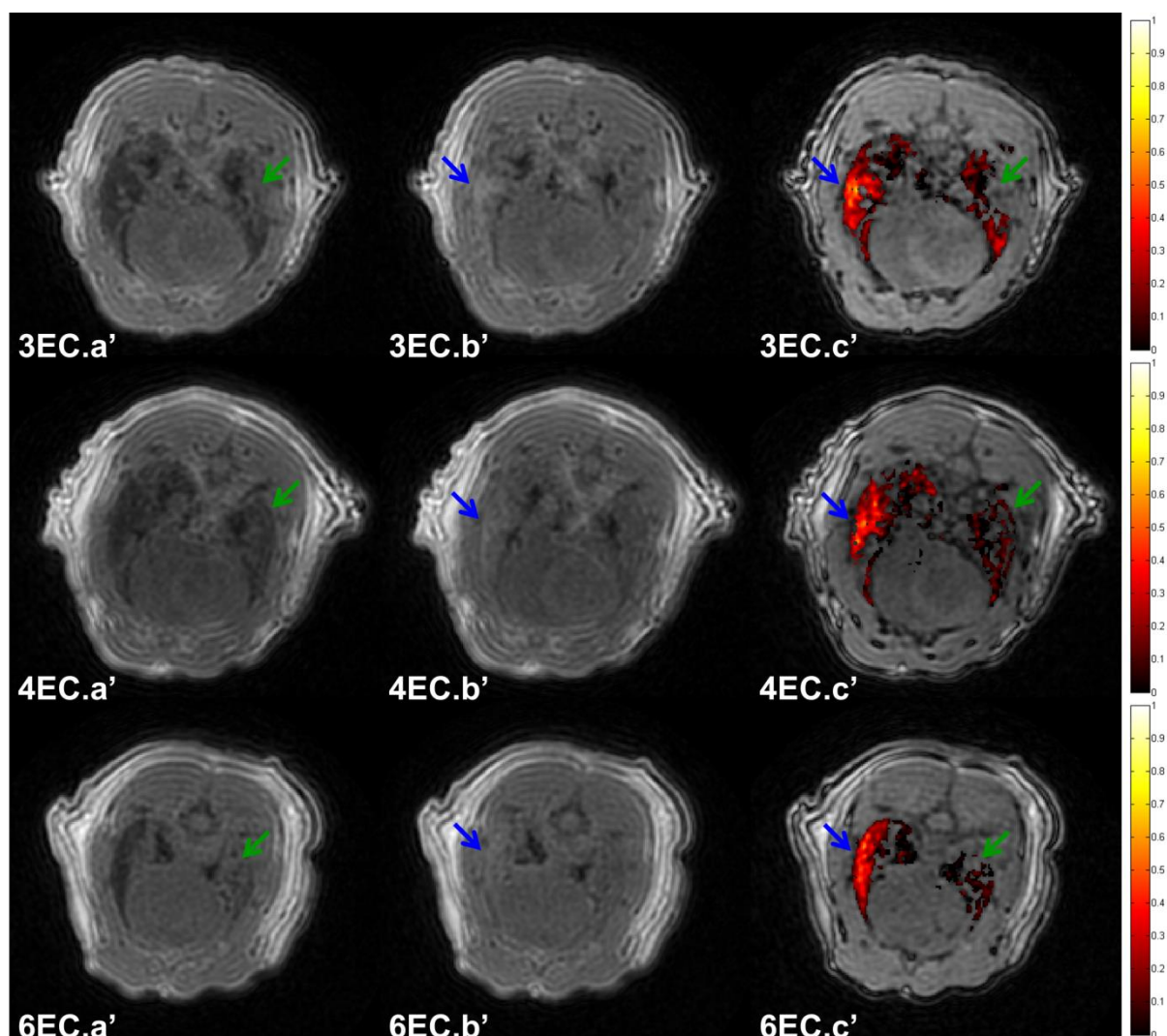


Figure 5.21. Pré- (a'), post- administration (b') et cartes de concentration de dépôt (c' ; mmol/L) chez les rats contrôles qui montraient des régions avec des dépôts plus élevés (rat 3EC, 4EC, 6EC). La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. Les lobes gauches de ces rats présentaient des défauts notables (flèches vertes), et les lobes droits montraient, au contraire, une densité de dépôt de particules plus importante (flèches bleues).

#### 5.5.6.2 Rats traités à l'élastase

Pour ce qui est des rats traités à l'élastase (Figure 5.22 et Figure 5.23), leur concentration moyenne de dépôt mesurée à la fin de l'administration était légèrement plus élevée par rapport aux rats contrôles, soit  $(0,19 \pm 0,02)$  mM vs.  $(0,17 \pm 0,02)$  mM. Ils avaient des **défauts parenchymateux visibles dans les régions basales antérieures** (Figure 5.22 et Figure 5.23) et également **dans les régions apicales** (Figure 5.24 et Figure 5.25, indiquées par les flèches vertes).



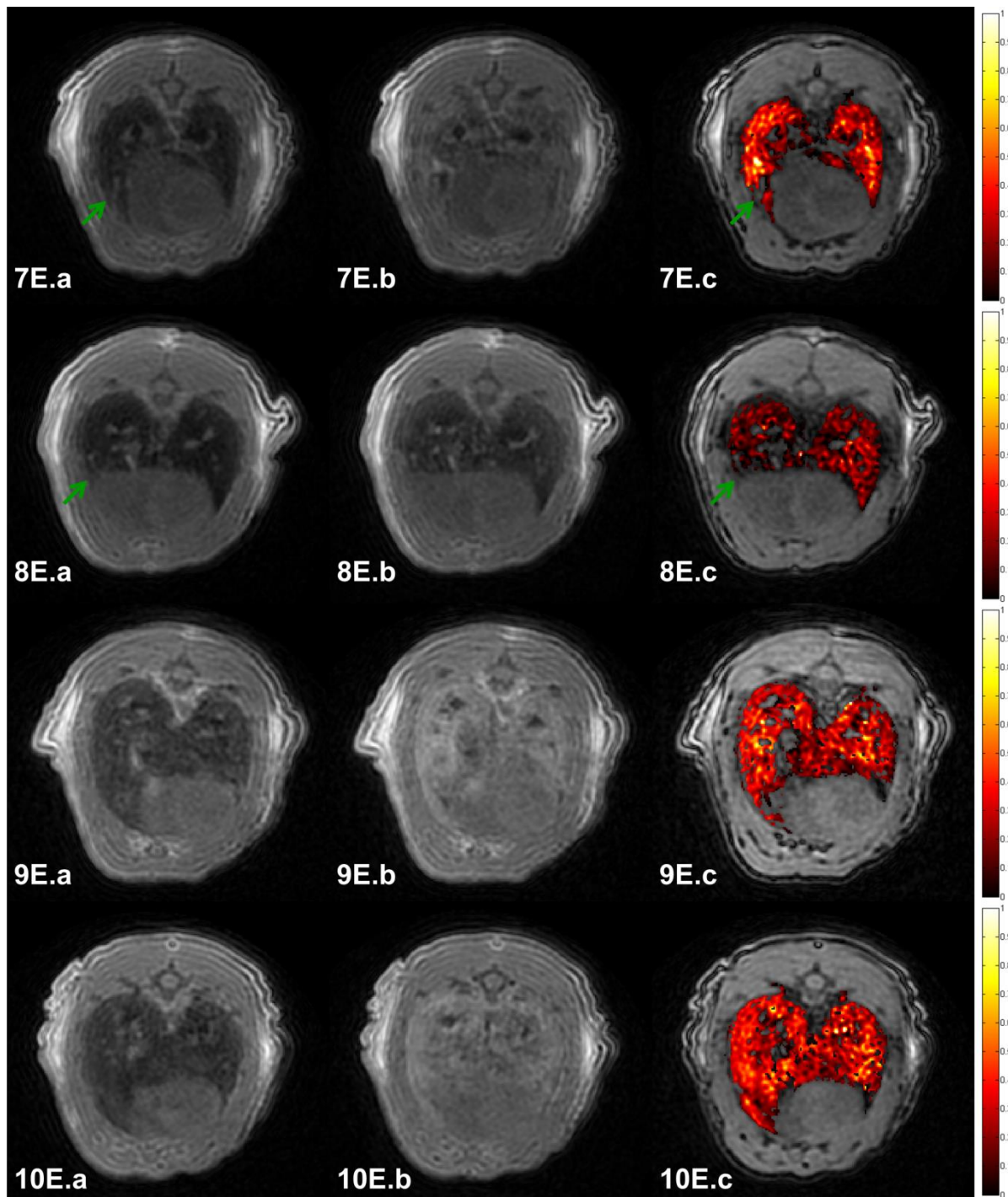


Figure 5.22. Pré- (a), post- administration (à la fin de la nébulisation, b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats traités à l'élastase (7E-10E). La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. Le SI est rehaussé d'une manière relativement hétérogène dans les poumons après l'administration de l'aérosol, en comparaison aux rats contrôles avec des poumons normaux. Les rats 7E et 8E présentaient des structures pulmonaires inhabituelles distinguables (flèches vertes).

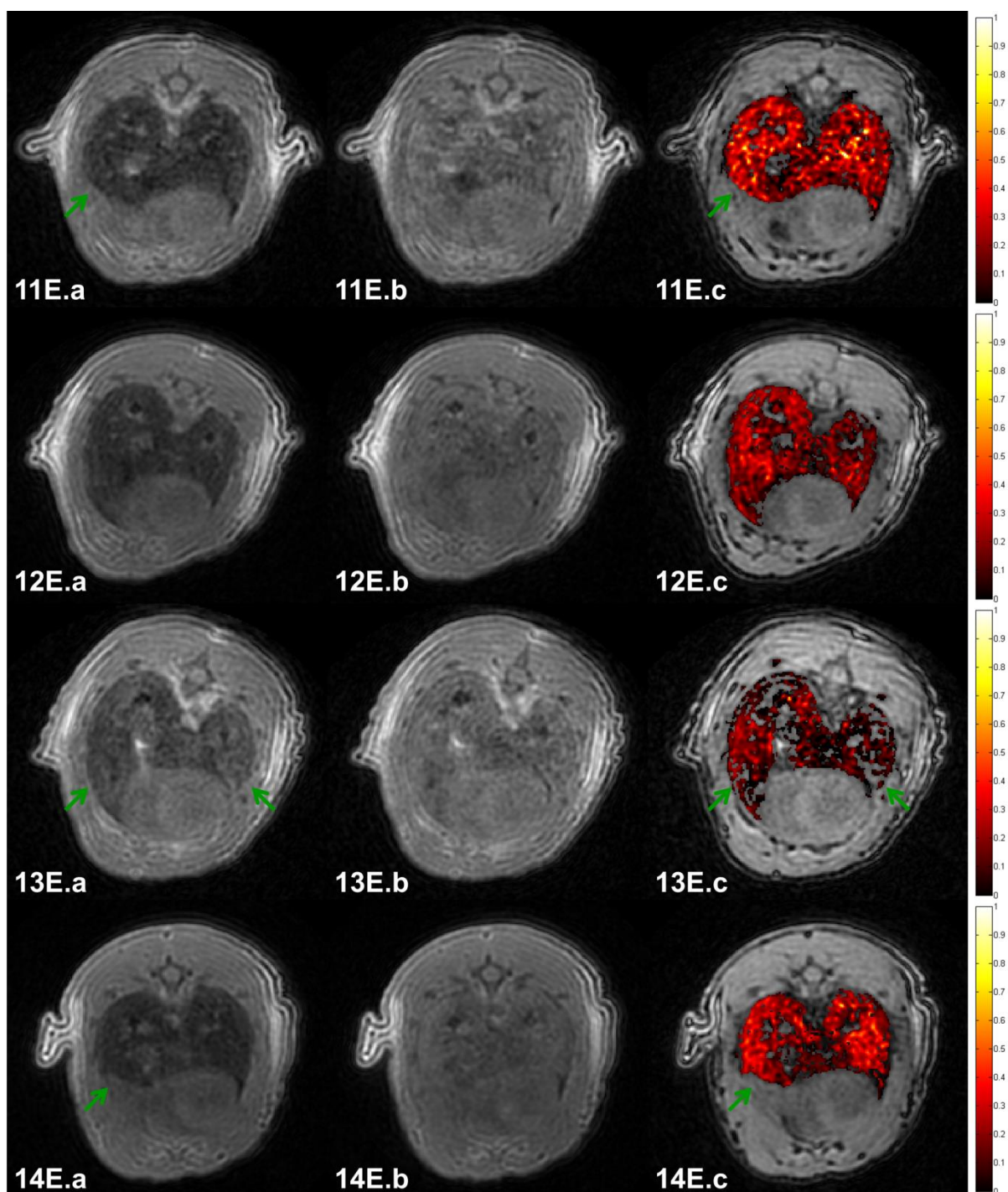


Figure 5.23. Pré- (a), post- administration (à la fin de la nébulisation, b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats traités à l'élastase (11E-14E). La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. Les défauts du parenchyme pulmonaire notables (flèches vertes) sont à l'origine de dépôts hétérogènes.

Les concentrations du dépôt de particules étaient différentes parmi les rats traités à l'élastase, probablement liées à la sévérité de l'emphysème. Les rats avec une concentration de dépôt plus faible montraient des défauts du parenchyme plus facilement détectables sur les acquisitions pré-contraste. Chez les rats qui présentaient moins de défaut emphysémateux (rat 7E, 9E, 10E et 11E), la concentration moyenne était de  $237,50 \pm 16,58 \mu\text{M}$ , à peu près 2 fois plus intense que les autres rats

(8E, 12E, 13E et 14E) qui ont une moyenne de  $142,50 \pm 19,08 \mu\text{M}$ . Parmi les rats qui reçoivent plus de dépôts dans les poumons, les rats 9E et 10E (Figure 5.24) présentaient une densité de particules plus élevée dans les lobes apicaux, soit  $550 \pm 4 \mu\text{M}$ , deux fois plus intense que celle dans leurs régions dites « normales » de  $250 \pm 11 \mu\text{M}$ . Pour des rats qui avaient des dépôts moins importants (8E, 12E, 13E et 14E), ils avaient les défauts importants sur le parenchyme pulmonaire dans la région intermédiaire (Figure 5.22 8E) ou les régions apicales (Figure 5.25). Ces défauts du parenchyme pulmonaire peuvent avoir été causés en partie par l'emphysème. Ils sont à l'origine des dépôts hétérogènes entre les deux lobes gauches et droits. Un exemple de cartes de concentration sans masquer les poumons est montré sur la Figure 5.26, confirmant que les aérosols n'atteignaient pas les régions avec des défauts pulmonaires sans rehaussement de contraste.

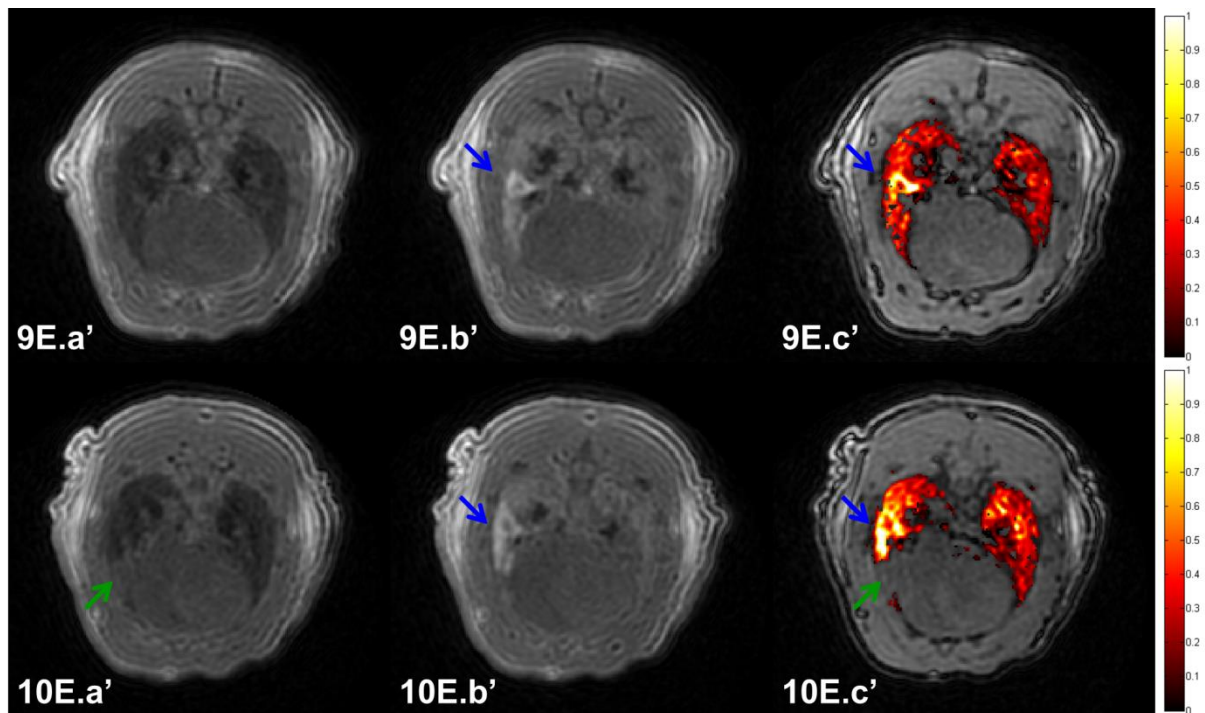


Figure 5.24. Pré- (a'), post- administration (b') et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez rats emphysémateux (9E-10E) qui montraient des régions avec des dépôts hyper-intenses. La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. Les taches avec une densité de dépôt plus intense se trouvent dans les lobes apicaux (flèches bleues), de manière similaire à ce qui a été observé chez les rats contrôles. Chez le rat 10E, les défauts pulmonaires étaient plus facilement identifiable (flèche verte).



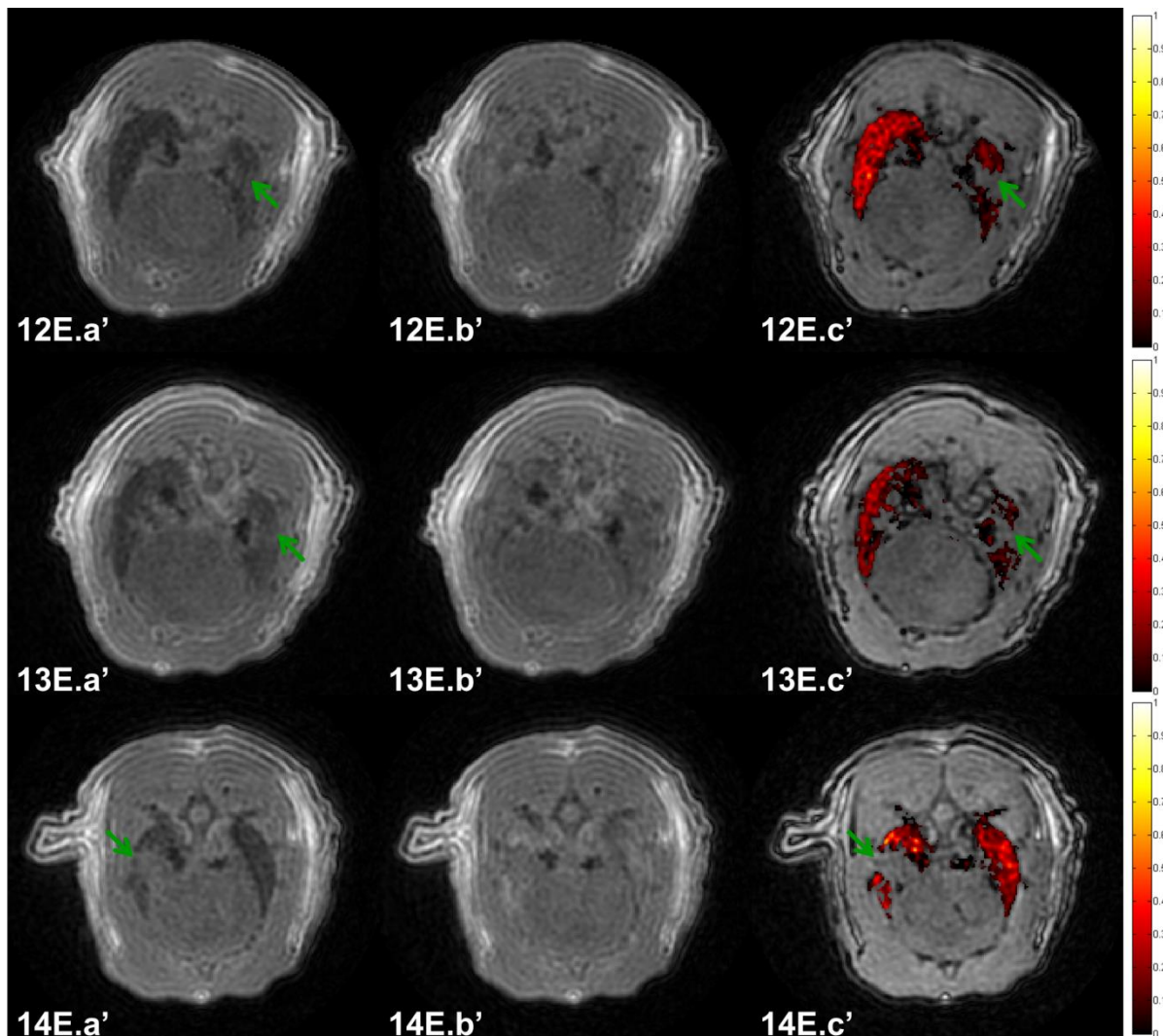


Figure 5.25. Pré- (a'), post- administration (b') et cartes de concentration de dépôt (c' ; mmol/L) chez les rats emphysémateux (11E-14E) dans les régions apicales où se trouvent les défauts importants observés sur le parenchyme pulmonaire probablement causés par l'emphysème (flèches vertes). La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. Les défauts du parenchyme pulmonaire sont à l'origine des dépôts hétérogènes remarquables entre les deux lobes gauches et droits.

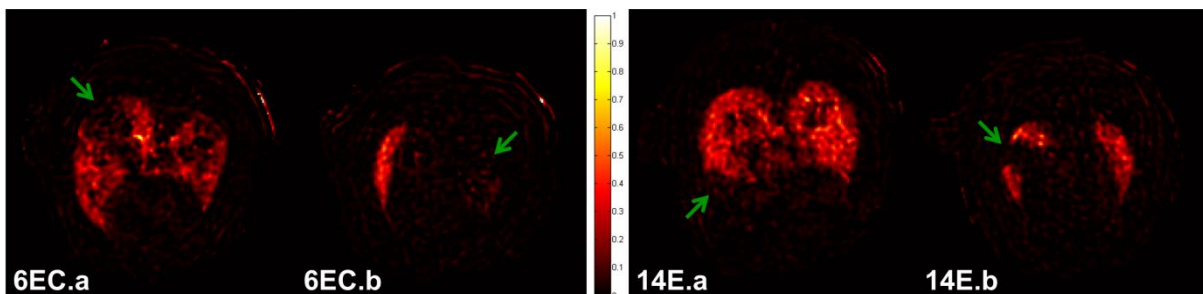


Figure 5.26. Exemples de cartes de concentration sans masquer les poumons chez le rat contrôle 6EC et chez le rat emphysémateux 14E, dans les régions intermédiaires (a) et apicales (b). Les régions avec des défauts pulmonaires (flèches vertes) n'ont pas pris du contraste, correspondant aux cartes de concentration présentée masquées, confirmant que les aérosols n'atteignaient pas ces régions.

### 5.5.7 Distribution régionale

Dans le groupe de rats contrôles (Figure 5.27, barres bleues), une hétérogénéité significative ( $p < 0,01$ ) sur la distribution a été observée dans les directions pied vs. tête ( $(53,23 \pm 1,38)\%$  vs.  $(46,77 \pm 1,38)\%$ ) et centrale vs. périphérique ( $(53,66 \pm 0,50)\%$  vs.  $(46,34 \pm 0,50)\%$ ). Cependant l'hétérogénéité n'était pas présente dans les directions suivantes : gauche vs. droite ( $(48,94 \pm 2,66)\%$  vs.  $(51,06 \pm 2,66)\%$ ) et antérieure vs. postérieure ( $(49,21 \pm 1,10)\%$  vs.  $(50,79 \pm 1,10)\%$ ).

Dans le groupe de rats traités à l'élastase (Figure 5.27, barres vertes), les résultats sont les mêmes, avec une hétérogénéité de distribution dans les directions respectivement pied vs. tête ( $(52,13 \pm 1\%$  vs.  $47,87 \pm 1\%)$ ) et centrale vs. périphérique ( $(54,86 \pm 0,82)\%$  vs.  $(45,14 \pm 0,82)\%$ ). De même, l'hétérogénéité n'était pas présente dans les directions gauche vs. droite ( $(48,89 \pm 2,23)\%$  vs.  $51,11 \pm 2,23\%)$ ) et antérieurs vs. postérieurs ( $(48,19 \pm 0,96)\%$  vs.  $51,81 \pm 0,96\%)$ ).

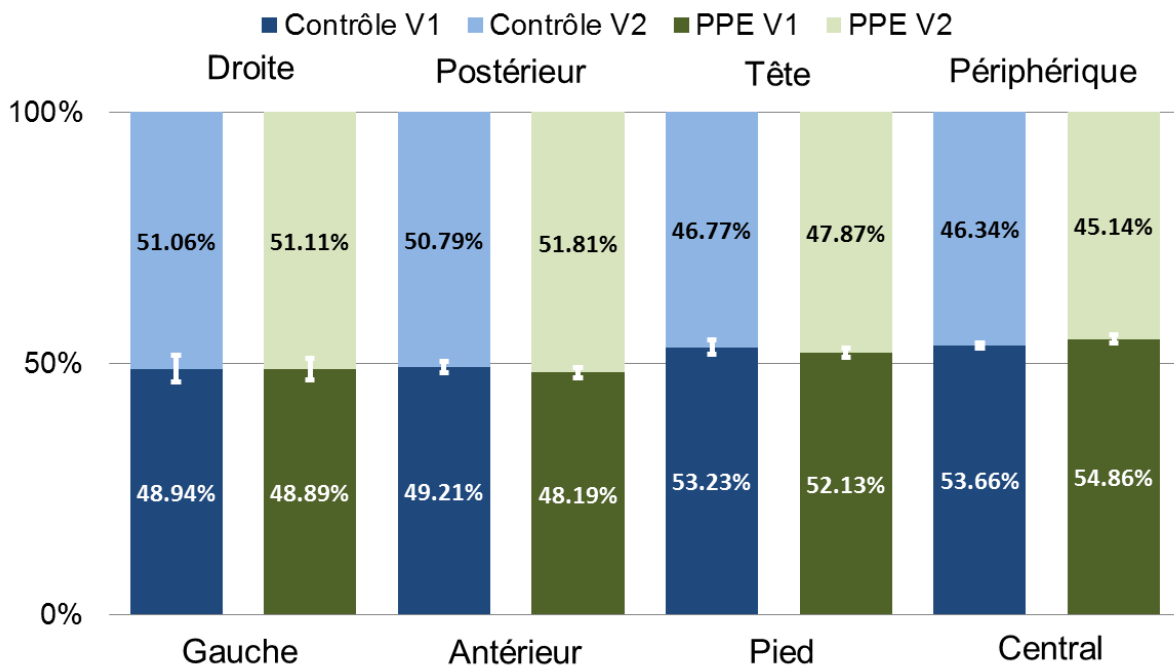


Figure 5.27. Une hétérogénéité significative ( $p < 0,01$ ) du dépôt est observée dans la direction Tête/Pied, Central/Périphérique pour les rats contrôles ainsi que pour les rats traités à l'élastase.

### 5.5.8 Effet de l'emphysème sur les dépôts d'aérosol

#### 5.5.8.1 Dispersion sur la distribution des paramètres RMN

Dans la Table 5.10, les RD de différents paramètres RMN sont comparés, respectivement la concentration d'aérosol, le SI et le  $R_2^*$ . Entre les rats contrôles et traités à l'élastase, il n'y a pas de différence significative de RD en moyenne.

Contrôle							
No. rat	1EC	2EC	3EC	4EC	5EC	6EC	moyen±SEM
RD de C	0,61	0,78	0,88	0,73	0,69	0,79	0,75±0,04
RD de SI pré	0,25	0,25	0,25	0,20	0,21	0,23	0,23±0,01
RD de SI post	0,26	0,26	0,29	0,23	0,22	0,24	0,25±0,01
RD de $R_2^*$ pré	0,47	0,52	0,54	0,44	0,46	0,50	0,49±0,02
RD de $R_2^*$ post	0,49	0,48	0,58	0,50	0,50	0,52	0,51±0,01

Traités à l'élastase									
No. rat	7E	8E	9E	10E	11E	12E	13E	14E	moyen ± SEM
RD de C	0,59	1,36	0,58	0,87	0,63	0,61	0,75	0,54	0,74±0,10
RD de SI pré	0,22	0,23	0,21	0,20	0,27	0,19	0,26	0,19	0,22±0,01
RD de SI post	0,22	0,23	0,28	0,24	0,28	0,23	0,27	0,22	0,25±0,01
RD de $R_2^*$ pré	0,47	0,55	0,41	0,47	0,55	0,46	0,49	0,48	0,48±0,02
RD de $R_2^*$ post	0,43	0,51	0,50	0,58	0,46	0,47	0,64	0,52	0,51±0,02

Table 5.10. Dispersion relative (RD) de la concentration d'aérosol (C), de l'intensité du signal (SI) pré- et post-contraste, et de  $R_2^*$  pré- et post-contraste dans les groupes de rats contrôles et traités à l'élastase.

## 5.6 Discussion sur le modèle emphysémateux

Nous discutons ici les causes possibles des effets observés sur les modèles emphysémateux et les mettons en regard d'études précédentes. Les parties sont organisées comme dans la discussion sur les rats asthmatiques, suivant l'ordre de résultats présentés.

### 5.6.1 Intensité de signal, profil respiratoire et effet $R_2^*$

En résumé, peu de différences ont été observées entre les rats contrôles et les rats emphysémateux. Les signaux pré- et post-contraste, ainsi que le RSB pré- et post-contraste, étaient comparables. Les deux groupes possédaient des paramètres respiratoires comparables (volume pulmonaire et fréquence respiratoire), ce qui indique que l'emphysème n'a pas beaucoup influencé le profil respiratoire. Un  $R_2^*$  pré-contraste comparable indique que l'élargissement de l'espace aérien distal dans le cas d'emphysème n'affecte pas significativement l'effet de susceptibilité air-tissu. Néanmoins, une corrélation entre la variation de  $R_2^*$  et l'intensité de signal pré-contraste dans le groupe emphysémateux a été observée. Une concentration similaire étant mesurées avec  $(0,19 \pm 0,02)$  mM pour les rats traités à l'élastase contre  $(0,17 \pm 0,02)$  mM pour les rats contrôle, une variation de  $R_2^*$  post-contraste pourrait être expliquée par une compensation de susceptibilité plus faible dans un espace aérien élargi par rapport à un poumon contrôle. Cette observation hypothétique souligne davantage la complexité de la relaxation transversale apparente dans les poumons par rapport à la discussion du chapitre 4.4.9.

### 5.6.2 Evolution temporelle de la prise de contraste

La variation importante de durée d'aérosolisation, qui est *a priori* due aux différents nébuliseurs utilisés pour l'étude sur les rats emphysémateux et à leur potentielle variabilité, n'a pas beaucoup influencé le rehaussement maximal dans les poumons. Avec des RSE comparables entre les deux groupes, une dose totale similaire était administrée aux poumons de rats après l'administration, quelle que soit sa durée de l'ordre de 40 min.

La taille des voies aériennes des rats de ~300g (pour l'étude sur rats emphysémateux) est considérée comme plus grande que celle des rats de ~200g (rats sains du Chapitre 4). Le rehaussement de signal similaire observé entre les rats contrôles de 300 g et sains de 200 g pourrait être dû partiellement aux défauts du parenchyme observés dans les rats contrôles instillés avec une solution saline. Un remodelage du parenchyme pourrait compenser l'effet du dépôt d'aérosol dû à l'agrandissement de section de passage dans les voies aériennes. Comme éléments allant dans ce sens, les rats 1EC et 5EC qui présentaient une structure morphologique 'normale' (sans défaut), les RSE s'élevait jusqu'à 74% et 66%, comparables au rehaussement chez les rats contrôles ~300g dans le lot asthmatique (101% et 60%).

### 5.6.3 Carte de concentration du dépôt d'aérosol et distribution régionale

Les hyper-signaux 'anormaux' pré-contraste et la concentration totale plus faible observés chez des rats contrôles 3EC, 4EC et 6EC sont probablement dus aux défauts de la structure pulmonaire. Cet effet sur le rehaussement total, ainsi que l'observation de défauts avant même l'administration d'aérosol suggèrent que l'instillation de solution saline, et par extension l'instillation endotrachéale réalisée ici, est potentiellement traumatique. Certains rats avec les parenchyms pulmonaires plus sensibles peuvent présenter une inflammation (297 - Hagler 1994). Ces observations pourraient être confirmées par les analyses histologiques.

Ici, les rats contrôles sont traités par instillation endotrachéale de solution saline à l'aide d'une seringue. En clinique, il y a des questionnements concernant l'utilisation de solution saline instillée lors de la succion de sécrétion endotrachéale et trachéostomie. Des effets indésirables tels que la désaturation d'oxygène artériel et des tissus (298 - Ackerman 1998, 299 - Kinloch 1999), ainsi qu'une réduction des colonies bactériennes conduisant une contamination de voies aériennes inférieures (297 - Hagler 1994, 300 - Freytag 2003) ont été rapportés. Bien que l'instillation intratrachéale de solution isotonique (type solution saline) soit un modèle contrôle conventionnel pour étudier la pneumonie (301 - Marzola 2005), l'œdème pulmonaire (302 - Beckmann 2001) ou l'inflammation (303 - Conti 2010), cette voie d'administration peut potentiellement induire des réactions inflammatoires sous forme d'accumulation liquide détectée alors par des hyper-signaux en IRM, comme observées pour les rats 3EC, 4EC et 6EC.

L'hétérogénéité de la distribution du dépôt d'aérosol n'était pas remarquable dans les voies aériennes des rats traités à l'élastase en excluant les régions 'anormales' qui présentaient des défauts pré-

contraste. Comme mentionné précédemment, la valeur  $T_{1,0}$  (1,1 s) du poumon potentiellement surestimée pour les rats emphysémateux produit une quantification des dépôts également légèrement surestimée et peut représenter un biais à prendre en compte. Les distributions régionales étaient comparables entre rats contrôles et rats traités à l'élastase. L'inflammation potentielle présente pour certains rats contrôles et les symptômes emphysémateux non-confirmés par histologie complique la discussion comparative sur les distributions régionales observées.

#### **5.6.4 Dispersion de distribution des paramètres RMN**

Des dispersions comparables entre rats contrôles et traités à l'élastase ont été observées. Cette observation est contradictoire à celle de Sweeney (304 - Sweeney 1987) et Oakes (305 - Oakes 2014), qui ont observés des dépôts de particules plus hétérogènes en présence de morphologie pulmonaire et de compliance de tissu modifiées par l'emphysème. Cette différence pourrait due à l'absence et la distribution limitée de symptôme emphysémateux chez certains rats traités à l'élastase et la présence de l'inflammation chez certains rats contrôles traités par solution saline. Une évaluation de RD par lobes dans deux groupes de rats pourrait potentiellement être plus représentative d'une distribution hétérogène du dépôt d'aérosol induit par la morphologie pulmonaire modifiée dans l'emphysème.

#### **5.6.5 Modification morpho-pathologique des poumons et dépôt d'aérosol**

Chez les rats emphysémateux, nous n'avons pas observé de corrélation entre la quantité de dépôt et l'intensité de signal pré-contraste, ainsi qu'entre la concentration de dépôt et le  $R_2^*$  pré-contraste, alors que ces effets ont été vu pour les rats sains lors de la mise en place du protocole d'imagerie. La procédure de dépôt d'aérosol (durée d'administration variable), la différence de structure pulmonaire modifiée par l'instillation, et les mécanismes du dépôt régional potentiellement modifiés ont pu jouer pour réduire la sensibilité à détecter ces liens. Dans les études sur le développement de modèle, certaines difficultés techniques ont été rencontrées également. Notamment, la disparité des grades dans l'emphysème peut être due à l'instillation intratrachéale qui ne permet pas de répartir de manière homogène l'élastase. Il y a aussi une différence de sensibilité inter-individus, par conséquent il a été montré qu'il n'y a pas de dépendance entre la dose d'élastase et l'intensité de l'emphysème.

Dans les études précédentes sur le dépôt d'aérosol dans les poumons emphysémateux chez les animaux ou chez l'homme, Sweeney et al. (304 - Sweeney 1987) ont observé un dépôt plus faible de particule de  $0,45\ \mu\text{m}$  chez les hamsters traités à l'élastase en respiration spontanée, par rapport à des hamsters sains. Damon et al. (306 - Damon 1983) ont trouvé également un dépôt plus faible chez des rats traités à l'élastase comparés à des rats sains, avec des conditions de respiration spontanée par le nez exposé aux particules de  $(2 \pm 1,84)\ \mu\text{m}$  de MMAD. En revanche, Kim et al. (307 - Kim 1997) ont effectués une étude chez l'homme lors d'une respiration contrôlée d'aérosol de  $1\ \mu\text{m}$  de diamètre, qui montrait un dépôt de particules plus élevé chez des patient souffrant de maladies respiratoires chroniques par rapport à des sujets normaux. Plus récemment, Oakes et al. (305 - Oakes 2014) ont observé chez des rats traités à l'élastase ventilés mécaniquement par trachéostomie avec des particules de  $1,2\ \mu\text{m}$  de MMAD, qu'un dépôt de particules plus élevé comparés aux rats sains était obtenu. Ici,



une concentration moyenne quasiment identique (de 11% plus élevée chez les rats traités à l'élastase) a été obtenue comparés aux rats contrôles, avec des variations individuelles importantes dans les deux groupes. Les paramètres individuels tels que les profils respiratoires, l'état de sévérité d'emphysème et la répartition de l'élargissement de l'espace alvéolaire par lobe (région et grade) interviennent tous sur la quantité de dépôts dans les voies aériennes montrant la complexité du phénomène et la difficulté à expliquer les différences avec les études précédentes.

Dans notre étude, les rats contrôles et emphysémateux étaient traités par instillation intratrachéale. Il est clair que l'UTE permet de voir que cette procédure produit des défauts du parenchyme localisés facilement détectables pré-contraste. Il est critique pour conclure sur la capacité de la technique à évaluer l'emphysème de compléter nos résultats avec des études histologiques ou par micro-CT pour évaluer le grade d'emphysème sur les animaux testés. Des analyses sont en cours avec l'aide de nos collaborateurs dans le projet.

## 5.7 Conclusion

La séquence 3D UTE pondérée  $T_1$  avec analyse du rehaussement de contraste produit par l'administration d'aérosol de Gd-DOTA en respiration spontanée a été appliquée sur des modèles d'animaux asthmatiques et emphysémateux. L'hétérogénéité de la distribution d'aérosol a été observée chez les rats asthmatiques (évaluée à partir de la dispersion relative) et était corrélée à l'index PenH. Ce résultat suggère que cette approche pourrait être utilisée comme un marqueur physiopathologique pour l'asthme. L'intensité de signal du parenchyme pré-contraste combinée avec la variation de  $R_2^*$  sont des marqueurs potentiels, à confirmer, pour l'emphysème.

La dose assez faible et les dépôts d'aérosol fortement hétérogènes mesurés dans les poumons des rats asthmatiques peuvent être liés à la bronchoconstriction induite lors de la crise d'asthme, qui génère une augmentation des vitesses du gaz et potentiellement de la turbulence. La redistribution d'aérosol observée après l'arrêt d'administration pourrait être due à la variation de la résistance de voie aérienne au cours de l'expérience lors d'une évolution de la crise d'asthme. La réduction de  $R_2^*$  observée systématiquement confirme les effets obtenus sur rats sains et sont explicables par des effets de compensation de susceptibilité.

Chez les rats emphysémateux, la corrélation négative entre l'intensité de signal pré-contraste et la variation de  $R_2^*$  pourrait être expliquée par une compensation plus faible de susceptibilité dans un espace aérien plus large par rapport aux poumons des rats contrôles : une concentration similaire était mesurée, on s'attendrait donc à une compensation identique si la structure pulmonaire était identique. Cette observation met l'accent sur la complexité de la relaxation transversale apparente dans les poumons. Les hyper-signaux inhabituels observés pré-contraste pour certains rats contrôles pourraient avoir été induit par l'instillation intratrachéale de solution saline, qui pourrait générer une inflammation pulmonaire. Les symptômes emphysémateux pourraient avoir été limités chez les rats emphysémateux, car une dispersion relative et des distributions régionales comparables étaient

observées. Une étude histologique ou par micro-CT peuvent fournir des informations complémentaires aux résultats de l'IRM, notamment pour évaluer la sévérité de l'emphysème.

La séquence 3D UTE est un outil efficace pour mesurer le dépôt d'aérosol de manière résolue dans les poumons et applicable sur des modèles de maladies respiratoires. Des défauts du parenchyme sont détectables. Il y a des différences significatives de dépôt et de cinétique d'élimination pour le modèle asthmatique avec le type d'aérosol testé. Il n'y en a pas ou peu pour le modèle emphysémateux. Cette technique quantitative pourrait être appliquée pour étudier l'impact du mélange de gaz hélium/oxygène et de la taille effective des particules sur les dépôts d'aérosol pour des modèles de maladies respiratoires et potentiellement en clinique.

## Conclusions et perspectives

L'administration de médicaments par voie inhalée est une approche intéressante pour le traitement des maladies pulmonaires, ainsi que pour la thérapeutique potentielle de maladies systémiques. De plus, le poumon, comme organe assurant les échanges gazeux, est en exposition directe aux particules en suspension dans l'air. Ces aspects nécessitent une meilleure compréhension du comportement des particules dans les poumons. En effet, le transport et les dépôts de particules dans les poumons sont complexes et difficiles à prédire. Pour mieux explorer les devenir des particules inhalées, des outils d'imagerie peuvent être développés. Cette étude, basée sur l'IRM, visait à développer des méthodes et outils pour cartographier la distribution spatiale du dépôt d'aérosol dans les voies aériennes et caractériser sa cinétique d'élimination des poumons chez des petits animaux *in vivo*.

De manière générale, l'IRM est un outil performant et non-invasif qui permet de fournir des informations qualitatives et quantitatives avec une résolution spatiale et/ou temporelle relativement élevée. Bien qu'il y ait des limitations à l'imagerie pulmonaire par IRM, les progrès techniques et les multiples mécanismes de contraste peuvent être mis à profit pour étudier les aspects anatomiques et fonctionnels du poumon. A l'aide de gaz détectables par IRM, hyperpolarisés ou à polarisation thermique, la morphologie des poumons, la ventilation, la perfusion ainsi que la diffusion dans les poumons sont désormais mesurables. A la vue de leur facilité d'utilisation, les gaz fluorés à polarisation thermique présentent des avantages pour imaginer la ventilation et un potentiel important pour un transfert en clinique. Par rapport aux preuves de concepts déjà effectuées dans la littérature, il reste des marges de manœuvre pour tirer profit de l'avancement technique (tel que l'imagerie parallèle) pour augmenter la sensibilité de cette approche. En ce qui concerne l'imagerie du parenchyme pulmonaire en proton, la technique à temps d'écho ultracourt UTE est une approche prometteuse, avec sa bonne sensibilité pour le parenchyme pulmonaire et la faible influence des artefacts de mouvements respiratoires et du  $T_2^*$  court des poumons.

La géométrie des poumons est complexe, notamment les zones alvéolaires qui constituent la majorité du volume. Le transport et les dépôts d'aérosol dans les poumons sont influencés par la morphologie des voies aériennes, le profil respiratoire, les conditions de ventilation et les propriétés aérodynamiques du gaz et des particules. En particulier parmi ces facteurs, la taille des particules et le profil respiratoire sont prédominant pour expliquer la distribution et les dépôts régionaux. Le diamètre aérodynamique médian en masse des particules (MMAD) générée par un nébuliseur à maille vibratoire a été caractérisé respectivement en utilisant un impacteur en cascade et une technique de diffraction laser, donnant toutes deux des résultats dépendants des propriétés physico-chimiques des substances ainsi que de la configuration de la ligne d'entrée du gaz dans le système mis en place pour le rat. Dans cet étude, l'inhalation par le nez en respiration spontanée a été utilisée. En plus de nécessiter une mise en place relativement simple en terme d'expérimentation animale, elle est considérée comme la technique la plus appropriée pour respecter le profil respiratoire physiologique, faire état des propriétés aérodynamiques de l'aérosol et produire une distribution de particule homogène dans les

poumons. En ce qui concerne le modèle animal, le rat Wistar a été retenu car il possède une sensibilité suffisante permettant d'induire des maladies respiratoires (l'asthme et l'emphysème) rapidement et d'effectuer leur suivi longitudinal.

Du point de vue méthodologique, l'imagerie des aérosols, basée ici sur des agents de contraste par IRM, pose une question importante de sensibilité de détection. Dans un premier temps, une série d'expériences a été effectuée sur fantôme pour étudier ces aspects. Le cas idéal de solutions d'agent de contraste placés dans des cylindres orientés dans le sens du champ  $B_0$  principal a été traité pour évaluer théoriquement et expérimentalement la précision de détection sur deux types d'agents de contraste conventionnels (agent dit  $T_1$ , des chélates de Gd, et agent dit  $T_2$ , des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques). Les résultats suggèrent qu'avec un système clinique à 1,5 T associé à des paramètres d'imagerie et un appareillage standards, la concentration dérivée de la phase (décalage de fréquence) peut être plus précise que la quantification dérivée de l'amplitude (dispersion de fréquence). Une analyse combinée des effets de phase et d'amplitude dans les séquences en écho de gradient multi-échos peut idéalement améliorer la quantification et réduire les seuils de détection basés sur les effets transversaux. Il est plus standard et faisable *in vivo* sur les poumons d'utiliser une quantification basée sur  $R_1$  et  $R_2^*$ , et les erreurs de quantification issues de ces deux contrastes ont ensuite été analysées. La quantification  $R_1$  obtenue ici est dérivée du rehaussement de signal *pre-versus* post-injection d'un agent. La quantification  $R_2^*$  est basée sur l'acquisition à partir de 2 temps d'écho TE. Pour des tissus comme le parenchyme pulmonaire qui a un  $T_2^*$  court, les précisions entre les deux méthodes sont liées et montrent une supériorité de l'usage du contraste  $R_1$  avec des paramètres d'acquisition réalistes lors d'ajout de Gd-DOTA dans les poumons. La différence importante de susceptibilité magnétique entre l'air et le tissu rend la forme du signal RMN complexe dans le parenchyme pulmonaire. Par conséquent, une simple décroissance exponentielle pour décrire  $R_2^*$  est en elle-même limitée et la quantification associée à ces effets difficile.

Dans une optique d'évaluation de la faisabilité d'approches quantitatives par IRM, un système double noyaux proton-fluor a été mis en place pour déterminer la sensibilité de l'imagerie de gaz et des aérosols fluorés. Le système a été testé sur des rats. Le protocole d'administration de l'aérosol fluoré par inhalation spontanée par le nez n'a pas permis d'obtenir une sensibilité suffisante pour détecter le signal provenant d'un dépôt dans le poumon de rat. Cela pourrait dû au filtrage important dans la région extrathoracique et l'évaporation rapide des aérosols fluorés lors de la nébulisation ou de la respiration. Le seuil de sensibilité estimé est de l'ordre de 0,5 M en  $\sim 1$  min, ce qui nécessite une accumulation importante de particules fluorés dans les voies aériennes pour être détectable. Un protocole d'intubation intratrachéale avec une nébulisation d'un jet d'aérosol pourrait éventuellement administrer les aérosols avec une quantité contrôlée et plus élevée dans les poumons. Cette approche pour quantifier les dépôts avec des résolutions spatiales et temporelles acceptable semble assez faisable. L'imagerie du gaz fluoré ( $\text{SF}_6$ ) a donné des résultats positifs montrant la possibilité d'avoir une mesure de la ventilation dans les poumons de rat sur un système clinique avec des temps d'acquisition de quelques minutes et des voxels de l'ordre de 10  $\mu\text{L}$ .

Pour obtenir un signal exploitable du parenchyme pulmonaire chez le rat, une séquence IRM à temps

d'écho court a été enfin mise en place sur un système clinique à 1,5 T. Cette technique a été combinée à une administration de courte durée d'un aérosol de Gd-DOTA en respiration spontanée. Le protocole d'imagerie est faisable pour estimer la concentration locale avec une résolution spatiale de (0,5 mm isotrope) et temporelle de 7,5 min permettant également de suivre l'élimination pulmonaire au cours du temps, et est reproductible sur six animaux. Un rehaussement de signal significatif dans le parenchyme pulmonaire (50% en moyenne), une distribution homogène de dépôt et une dose totale relativement faible ( $\sim 1 \mu\text{mol/kg}$  de poids corporel) ont été observés. Cette méthode fournit la première cartographie quantitative de concentration du dépôt d'aérosol *in vivo* par IRM et montre une sensibilité performante avec un seuil de détection de l'ordre de  $20 \mu\text{M}$  en  $\sim 7$  min avec des voxels de  $0,125 \mu\text{L}$ .

La séquence radiale 3D UTE pondérée en  $T_1$  a été utilisée pour sonder le dépôt d'aérosol, parce que (i) elle est peu sensible aux mouvements respiratoires, permettant une respiration spontanée pendant l'acquisition ; (ii) elle est moins sensible à  $T_2^*$  court dans les poumons, et à l'effet  $T_2^*$  induit par l'aérosol, par conséquent augmentant le signal du parenchyme pulmonaire pré-contraste, permettant la quantification du rehaussement de signal lors de l'administration de l'aérosol ; (iii) La quantification de l'effet  $T_1$  n'est pas limitée par l'hétérogénéité du profil de coupe, comme c'est le cas d'acquisition 2D avec son excitation sélective. Le rehaussement  $T_1$  permet de quantification de la distribution totale et régionale, en plus de dépôt déterminés avec la résolution spatiale de l'imagerie. Une tendance d'augmentation de  $T_2^*$  a été observée, ce qui est explicable par des effets de compensation de susceptibilité. Ces derniers effets avaient une influence limitée sur la quantification. L'administration par respiration spontanée ici est plus représentative de l'exposition chronique aux particules en toxicologie respiratoire et pour la thérapie par inhalation.

Après validation sur des rats sains, cette modalité d'imagerie a pu être appliquée chez des modèles d'animaux asthmatiques et emphysémateux. Cela confirme que la séquence 3D UTE est un outil efficace pour mesurer le dépôt d'aérosol de manière résolue dans les poumons et applicable sur des modèles de maladies respiratoires. Des défauts du parenchyme sont détectables. Il y a des différences significatives de dépôt et de cinétique d'élimination pour le modèle asthmatique avec le type d'aérosol testé. Il n'y en a pas ou peu pour le modèle emphysémateux.

Chez les rats asthmatiques, l'hétérogénéité de la distribution d'aérosol (évaluée à partir de la dispersion relative), corrélée à l'index PenH (paramètre indiquant la résistance des voies aériennes) suggère d'un marqueur physiopathologique pour l'asthme. La dose assez faible et les dépôts d'aérosol fortement hétérogènes mesurés dans les poumons des rats asthmatiques peuvent être liés à la bronchoconstriction induite lors de la crise d'asthme, qui génère une augmentation des vitesses du gaz et potentiellement de la turbulence. La redistribution d'aérosol observée par la cinétique après l'arrêt d'administration pourrait être due à la variation morphologique de voie aérienne lors d'une évolution de la crise d'asthme et a besoin d'un modèle cinétique plus complexe pour être analysée. La réduction de  $R_2^*$  observée systématiquement confirme les effets obtenus sur rats sains et sont explicables par des effets de compensation de susceptibilité.

Chez les rats emphysémateux, l'intensité de signal du parenchyme pré-contraste combinée avec la

variation de  $R_2^*$  sont des marqueurs potentiels et nécessite des études complémentaires pour être confirmé. La corrélation négative entre ces deux derniers paramètres pourrait être expliquée par une compensation plus faible de susceptibilité dans un espace aérien plus large par rapport aux poumons des rats contrôles, dans le cas d'une concentration similaire mesurée. Cette observation met l'accent sur la complexité de  $R_2^*$  dans les poumons. Les hyper-signaux inhabituels observés pré-contraste pour certains rats contrôles pourraient avoir été induit par l'instillation intratrachéale de solution saline qui pourrait générer une inflammation pulmonaire. Les symptômes emphysémateux pourraient avoir été limités, car une dispersion relative et des distributions régionales comparables étaient observées. Une étude histologique ou par micro-CT peuvent fournir des informations complémentaires aux résultats de l'IRM, notamment pour évaluer la sévérité d'emphysème et trancher sur la question de savoir si les animaux testés ont un grade d'emphysème limité ou si les dépôts de particules de  $2,5\mu\text{m}$  ne sont pas influencés par la maladie.

D'un point de vue de la méthodologie d'imagerie, des améliorations pourraient être menées dans un premier temps sur l'efficacité de l'administration. Le nébuliseur peut encore être approché plus près du nez du rat, ce qui pourrait permettre de réduire la perte dans la ligne d'entrée du gaz. Un aérosol avec des tailles de particules plus fines pourrait également être généré pour augmenter l'efficacité des dépôts et donc du rehaussement du parenchyme. Une ventilation mécanique synchronisée sur la respiration du rat pourrait aider à contrôler le profil respiratoire ainsi que la dose administrée. Un système adapté à l'imagerie multimodale sur le petit animal est en cours de développement au sein du laboratoire et permettra de comparer les dépôts d'aérosol obtenus par les différentes techniques, tout en gardant les mêmes conditions de ventilation. En ce qui concerne l'imagerie UTE, des échos encore plus courts pourraient être obtenus, pour encore plus réduire la sensibilité à la variation de  $R_2^*$ . Un réseau d'antennes thoraciques adapté au poumon du rat pourrait être utilisée afin d'améliorer la sensibilité de réception. La séquence UTE radiale pourrait potentiellement être combinée avec l'imagerie parallèle et les techniques de compress sensing pour accélérer l'acquisition. En revanche, l'imagerie des gaz fluorés à basse résolution est faisable sur le rat et pourrait être combinée à l'étude des dépôts pour avoir une estimation de la ventilation en parallèle.

En perspective, cette stratégie UTE-IRM d'imagerie fonctionnelle des dépôts et permettant la caractérisation de leur élimination, appliquée sur un système clinique avec un appareillage de nébulisation clinique et une dose faible inhalée, invite à envisager une transposition de la technique chez l'homme. Elle pourrait être appliquée pour étudier quantitativement *in vivo* l'impact du mélange de gaz hélium/oxygène et de l'efficacité des dépôts d'aérosol thérapeutique pour des modèles de maladies respiratoires. Par ailleurs, combinée avec des études multimodales, incluant la tomodensitométrie et l'imagerie nucléaire, elle ouvre une perspective pour l'exploration poussée des mécanismes de dépôts de particules inhalées.







## **Annexes**



## **A. IRM double résonance 19F-1H pour étudier l'administration et l'élimination de PFOC dans les poumons de rat**

### **A.1 Introduction**

Ce travail se situe à l'intersection de l'ANR Oxhelease, en ce qui concerne la mesure du dépôt d'aérosol dans les poumons de rats, et de l'ANR Tecsan 2011-2014 ABYSS (Hypothermie thérapeutique par ventilation liquide totale dans les suites d'un arrêt cardiaque réanimé). L'ANR ABYSS était conduite scientifiquement par Renaud Tissier (Ecole Vétérinaire de Maison-Alfort, INSERM U955-3, Créteil) et piloté par la société Bertin. Ce projet visait à développer un dispositif de ventilation liquide totale utilisant des perfluorocarbones pour l'homme. L'IR4M avait pour rôle de développer des outils de caractérisation par IRM du fluor. Ayant mis en place l'imagerie double résonance pour le rat, nous avons décidé de tester l'administration de perfluorocarbones nébulisés pour déterminer la sensibilité d'une telle approche pour caractériser les dépôts, tout en obtenant des données *in vivo* sur la tolérance de l'administration de tels produits.

La ventilation liquidienne avec des perfluorocarbones (PFC) a été proposée pour améliorer les échanges gazeux et la compliance pulmonaire chez l'homme ayant des insuffisances respiratoires aiguës (308 - Hirschl 1995). D'un point de vue chimique, ces liquides sont composés de fluor et ont une densité élevée, une tension superficielle faible et une solubilité élevée ce qui permet de faciliter le transport et la diffusion des gaz respiratoires (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) dans les poumons (309 - Clark 1966). Une autre application possible est l'hypothermie rapide à la suite d'un arrêt cardiaque réanimé avec ses bénéfices cardioprotecteurs (310 - Tissier 2007). Selon que le remplissage des poumons est total ou partiel, il s'agit de ventilation liquidienne totale (TLV) ou partielle (PLV). La procédure de TLV inclut une phase de remplissage, une phase de ventilation et une phase d'élimination à la suite de la procédure (évaporation ou autres phénomènes systémiques). Pour le transfert clinique potentiel de tels protocoles, la tolérance au produit est cruciale. L'imagerie fluor des poumons a été proposé pour visualiser les gaz (62 - Schreiber 2001), ou pour la ventilation liquidienne partielle (311 - Laukemper-Ostendorf 2002). Avec l'IRM double résonance, il a été montré que le perfluorooctane (PFOC) est mieux toléré que les autres PFCs chez le cochon de 30 kg (255 - Chenoune 2014). Dans notre étude *in vivo* sur le rat, du PFOC est nébulisé en respiration libre pour tester la faisabilité de l'imagerie des dépôts et évaluer l'élimination des poumons après administration.

### **A.2 Méthodes**

#### **A.2.1 Procédure d'administration**

Six rats Wistar (mâle, 6/7 semaines, 180 – 200g) ont été anesthésiés avec 2,5% d'isoflurane dans 1 L/min d'O<sub>2</sub> et placé dans l'IRM comme décrit dans le chapitre 4.1. Une dose de PFOC (C<sub>8</sub>F<sub>18</sub>; Sigma-Aldrich Chimie GmbH, Schnelldorf, Allemand) de 5mL a été aérolisé par le nébuliseur à maille vibratoire proche du nez du rat dans la ligne d'entrée anesthétique (Figure A.1). La nébulisation durait 5 à 10 minutes. Les rats ont été euthanasiés à la fin des sessions d'imagerie.

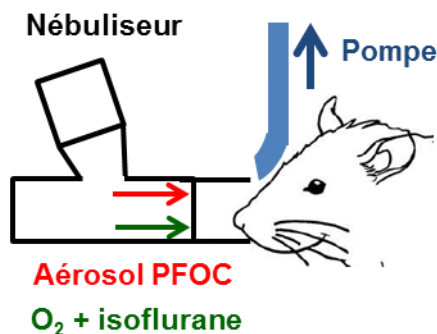


Figure A.1. Positionnement du nébuliseur mis au plus proche du nez de rat pour augmenter l'efficacité d'administration du PFOC.

### A.2.2 Expérience IRM

Le système d'imagerie et l'antenne double résonance utilisés sont décrits dans le chapitre 3.2. Le mode  $^1\text{H}$  a été utilisé pour la localisation anatomique. Une séquence en écho de gradient 3D a été appliquée avec les paramètres suivants :  $\text{TR} = 6,1 \text{ ms}$ ,  $\text{TE} = 2,7 \text{ ms}$ , angle de basculement  $20^\circ$ ,  $\text{FOV} = 128 \times 128 \text{ mm}^2$ , résolution  $= 1 \times 1 \times 5 \text{ mm}^3$ , 14 coupes. Le protocole d'acquisition  $^{19}\text{F}$  consistait en deux procédures différentes : (i) Lors d'une première nébulisation de PFOC de 5 mL, des spectres RMN dynamiques ont été acquis pendant toute la phase d'administration. Après l'arrêt de la nébulisation, les spectres dynamiques ont été acquis pendant toute la phase d'élimination. (ii) Lors d'une deuxième nébulisation de PFOC de 5 mL, les spectres RMN dynamique ont été acquis pendant la phase d'administration. Après l'arrêt de la nébulisation, une séquence en écho de gradient 3D a été effectuée pour suivre l'élimination du produit spatialement.

Les paramètres des spectres RMN étaient les suivants : une acquisition de signal de précession libre (FID) après une excitation spatialement non-sélective, avec  $\text{TE} = 90 \mu\text{s}$ , angle de basculement de  $90^\circ$ , signal moyenné par 16 accumulations, 32 scans dynamiques. Les paramètres de séquence de l'écho de gradient 3D étaient identiques à ceux utilisés en mode  $^1\text{H}$  avec le signal moyenné sur 128 accumulations. L'impulsion RF sélective lors de l'imagerie en écho de gradient avait une bande passante de 1828 Hz permettant d'imager le pic principal de PFOC dans un intervalle de  $\pm 15 \text{ ppm}$ .

### A.2.3 Traitement de donnée

Les spectres acquis contenant 2 régions (Figure A.2), avec une résonance à 0 ppm correspondant à l'isoflurane et au PFOC ( $\text{CF}_3$ ) et une résonance à -40 ppm (pic spécifique de PFOC correspondant aux signaux des groupements  $\text{CF}_2$ ). L'aire sous la courbe a été calculée sur chacune des deux régions pour tous les scans dynamiques et a été suivi en fonction de temps. L'évolution temporelle a été analysée à l'aide de 4 paramètres synthétiques (Figure A.3) : un délai entre le début de l'administration et l'apparition de signal de PFOC  $t_{\text{delay}}$ , un temps pour atteindre le maximum du signal  $t_{\text{to\_peak}}$ , la valeur du signal maximal  $S_{\text{peak}}$  et  $t_{1/2}$  correspondant à la durée pendant laquelle le signal décroît de moitié et caractérisant l'élimination. Les images  $^{19}\text{F}$  ont été superposées aux images  $^1\text{H}$  considérées comme la référence anatomique, permettant de localiser la présence du PFOC.

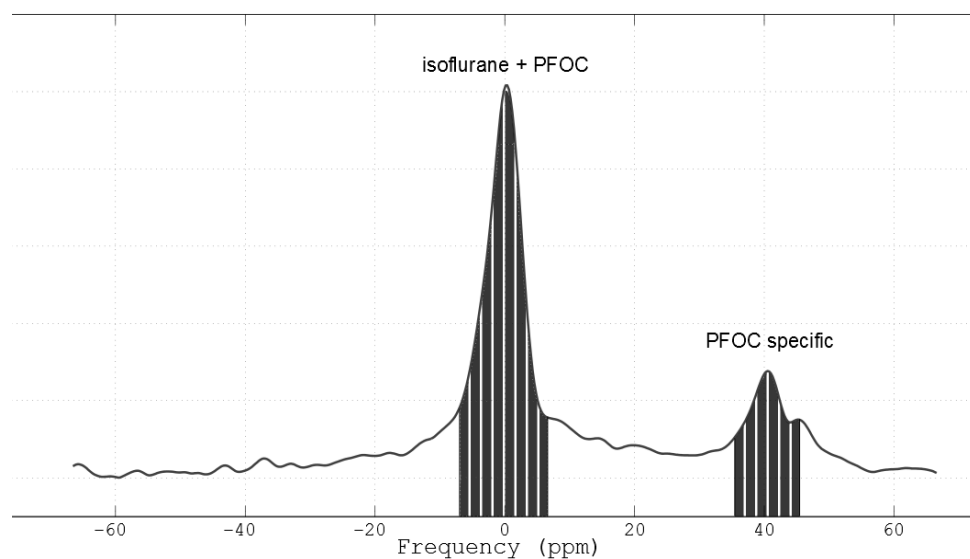


Figure A.2. Le spectre RMN de la prise et de l'élimination du PFOC après administration de l'aérosol. Les surfaces hachurées sont utilisées pour calculer l'aire sous la courbe.

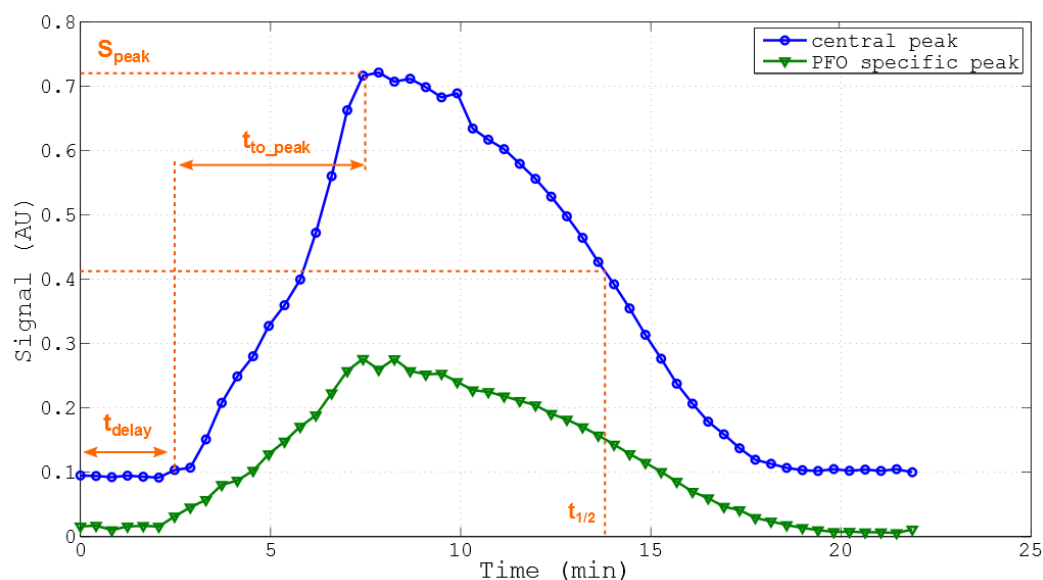


Figure A.3. Le spectre en fonction de temps montre une augmentation de signal pendant l'administration de PFOC et une décroissance pendant la phase d'élimination. Quatre paramètres ont été estimés sur la courbe pour caractériser la cinétique du signal du PFOC.

### A.3 Résultat

Les rats ont survécu au protocole expérimental sans changement significatif de fréquence respiratoire pendant la nébulisation de PFOC, ce qui indique une bonne tolérance de la procédure. Les images combinées de  $^1\text{H}$  et de  $^{19}\text{F}$  sont présentées sur la Figure A.4. Avant l'administration de PFOC, On détecte des signaux  $^{19}\text{F}$  provenant de l'isoflurane ; ces signaux sont relativement faibles et principalement localisés dans les graisses. Après la nébulisation de PFOC, au début de la phase d'élimination des poumons, le PFOC n'est pas détectable dans les poumons mais une quantité

importante est observée dans les tissus, notamment dans les graisses, en particulier dans la zone ventrale (Figure A.4 - 45mm). En ce qui concerne la cinétique du signal de PFOC, une cinétique typique est présentée sur la Figure A.3 et montrent : un délai avant la mesure effective du signal de PFOC ( $t_{\text{delay}} = 2,32 \pm 1,29$  min), une augmentation de PFOC atteignant un pic ( $t_{\text{to\_peak}} = 4,78 \pm 1,49$  min), suivi par une phase d'élimination ( $t_{1/2} = 11,86 \pm 1,43$  min). La durée entre le pic et le moment de  $t_{1/2}$  était 4,76 min, ce qui montre une élimination rapide des poumons.

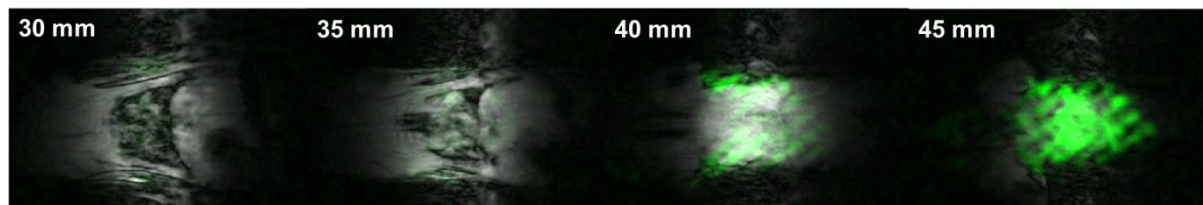


Figure A.4. Images superposées de  $^{19}\text{F}$  (vert) et  $^1\text{H}$  (niveaux de gris) sur différentes coupes acquises lors de la phase d'élimination. Le PFOC n'est pas détectable dans les poumons, alors que celui-ci est observé largement dans les graisses.

#### A.4 Discussion et conclusion

Ce travail applicatif des outils développés lors de cette thèse montre que l'imagerie des dépôts par IRM du fluor avec des perfluorocarbones liquides nébulisés est peu sensible. Cela peut être dû au TE long utilisé dans la séquence en écho de gradient, combiné avec un  $T_2^*$  du PFOC dans les poumons probablement court. En comparaison avec l'imagerie des dépôts de Gd-DOTA, on s'attend à plusieurs ordre de grandeur de perte en sensibilité avec cette détection directe. Néanmoins, cette étude est informative. L'accumulation de PFOC nébulisé est détectable dans les tissus est en particulier dans les régions de graisse, apparemment co-localisé avec l'isoflurane (312 - Mills 1987). Après le début de la nébulisation, un court délai de  $\sim 2,3$  min est mesuré pour le PFOC dans la région thoracique (zone de sensibilité de l'antenne RF). Le signal augmentait jusqu'à la fin de nébulisation, et ensuite décroissait rapidement preuve d'une élimination des poumons en  $\sim 5$  min. Le nébuliseur produit des particules de diamètre environ  $7\ \mu\text{m}$ , qui peuvent se vaporiser en entrant dans les poumons. Sous forme de particules ou de gaz, le PFOC dans le poumon est peu détectables, à cause de la faible concentration ou des paramètres de relaxation défavorables dans les poumons. Le transfert du PFOC dans la circulation sanguine et l'accumulation dans les tissus environnants de la région thoracique ont été observés. Cette accumulation est hypothétiquement systémique, et sous forme de gaz dissout. Une fois que l'administration est arrêtée, une élimination rapide a été observée, compatible avec une élimination respiratoire pulmonaire due à une réduction progressive de pression partielle alvéolaire en PFOC. Ces expériences préliminaires *in vivo* fournissent des éléments sur la pharmacocinétique du PFOC avec une élimination rapide de la région thoracique, potentiellement *via* la respiration. Cette hypothèse d'élimination rapide par voie pulmonaire et d'accumulation dans les tissus, à confirmer, apportent des éléments complémentaires aux études de tolérance *post-mortem* précédentes (255 - Chenoune 2014).

## **B.    *Résultat préliminaire de multi-modalités***

Cette partie présente les résultats préliminaires des techniques multimodales, respectivement par IRM, micro-CT et histologie sur le modèle de rats emphysémateux.

Dans une première phase, une étude multimodale a été mise en place pour valider le modèle animal. Un rat traité à l'élastase (415g) et un rat instillé avec une solution saline (408g) ont pu être caractérisés par IRM 9 semaines post-instillation. Ces rats ont ensuite été imagés par micro-CT puis ont eu un examen histologique. Nous noterons par la suite dans le texte le rat sensibilisé à l'élastase et le rat contrôle comme rat 0E et rat 0EC, respectivement.

### **B.1    IRM**

#### ***B.1.1    Adaptation du protocole IRM et de l'analyse***

##### **B.1.1.1            Adaptation du protocole d'imagerie**

Pour les rats emphysémateux (rat 0EC et rat 0E) qui avaient un poids plus important que les autres (> 400g), les expériences ont été effectuées avec l'antenne Flex-S [Philips Healthcare, Best, The Netherlands] car les rats ne rentraient pas dans l'antenne de 47 mm de diamètre. Cette antenne circulaire de 8 cm de diamètre était moins sensible et a donc nécessité d'adapter au protocole d'imagerie. Nous avons donc changé la taille du voxel de  $(0,5 \text{ mm})^3$  à  $(0,75 \text{ mm})^3$  et le champ de vue de 64 mm à 96 mm (382,2 Hz de bande passante par pixel). Les autres paramètres étaient identiques à ceux de l'acquisition réalisée sur les rats sains lors de la mise en place de la méthode (chapitre 4.1.3).

##### **B.1.1.2            Adaptation des ROI pulmonaires**

Dans le protocole précédent, le masque définissant la ROI pulmonaire était segmenté semi-automatiquement d'après les jeux de données  $R_2^*$  acquis aux deux TE court et long. Pendant les expériences, la position de rat 0E a changée après l'administration d'aérosol. Par conséquent, le masque extrait lors de l'acquisition pré-contraste n'était plus valable pour les séquences post-contraste. Pour limiter les effets sur l'analyse, nous avons défini deux masques correspondants chacun aux données de cartographie de  $R_2^*$  pré et post-administration. En particulier, nous avons dû faire davantage de segmentation manuelle des vertèbres.

### B.1.2 Synthèse des données quantitatives sur les rats

No. animal	Rat 0EC	Rat 0E
No. d'étude CERB	1302174	1302172
RSE post (%)	50,26	14,94
RSE max (%)	73,79	54,34
TTP (min)	27,33	31,73
RR (/min)	67	66
V <sub>ROI</sub> (mL)	5,76	6,81 (pré)
C <sub>dépôt</sub> (mM)	0,21±0,0053	0,23±0,003
Quantité du dépôt (μmol)	0,59	0,5
SI <sub>pré</sub>	2,24	1,83
SI <sub>post</sub>	3,33	2,16
RSB <sub>pré</sub>	13,36	10,4
RSB <sub>post</sub>	19,57	14,61
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>pré</sub> (s <sup>-1</sup> )	606,32±1,72	619,89±1,69
R <sub>2</sub> <sup>*</sup> <sub>post</sub> (s <sup>-1</sup> )	735,60±1,46	771,35±1,61
V <sub>cine</sub> (mL)	6,56	8,92
VC (mL)	2,63	3,59
Dose max (μmol)	88,81	119,42
Fraction effective (%)	0,66	0,42

Table B.1. Données analysées chez les rats de mise en place. Le volume pulmonaire du rat emphysémateux a été estimé par la segmentation sur l'acquisition pré-contraste. La quantité de dépôt a été calculée en considérant une fraction volumique de parenchyme pulmonaire de ~ 0,5 pour les deux rats. La fraction effective est le rapport entre la quantité de dépôt mesurée et la dose maximale administrée estimée.

### B.1.3 Intensité de signal

En comparant le rat contrôle (rat 0EC) avec le rat emphysémateux (rat 0E), nous avons observé que le RSB dans le poumon sur l'image de référence (pré-administration) du rat emphysémateux était plus faible (10,4 vs. 13,36, a.u.), ce qui suggère une destruction des voies aériennes à cause de l'emphysème. Il faut noter qu'ici avec la sonde SENSE-Flex-S (taille du voxel = 0,75 mm), nous avons une réduction du RSB du poumon de ~ 45% par rapport à celui obtenu par la sonde de 47 mm de diamètre (taille du voxel = 0,5 mm) utilisée dans l'étude sur les autres animaux. Avant administration, le rat emphysémateux avait ainsi une moyenne du signal pulmonaire plus faible (1,83 vs. 2,24, a.u.) et un volume pulmonaire plus grand (6,81 mL vs. 5,76 mL). Après administration, le rat 0E avait toujours une intensité du signal plus faible (2,16 vs. 3,33, a.u.).

### B.1.4 Profil respiratoire

La destruction de la paroi des alvéoles produisent une dilatation de volume global, avec l'intensité de signal provenant de parenchyme pulmonaire plus faible à cause d'un effet de susceptibilité



probablement plus important. Ce résultat sur le volume pulmonaire, comparé à l'estimation de volume par la séquence ciné synchronisée à la respiration, présentait une bonne correspondance : le rat emphysémateux de grade 3 avait un volume pulmonaire plus grand que le rat sain.

Ces deux rats de ~400g avaient une fréquence respiratoires similaires de 67 cycle/min. Le volume courant du rat 0E était beaucoup plus grand que celui du rat contrôle 0EC, 3,59 mL vs. 2,63 mL. Un volume courant plus large est en accord avec les études précédentes (313 - Emami 2011, 269 - Oakes 2014), ce qui correspondrait à une compli  ance pulmonaire augmentée due à une capacité réduite de rebond élastique de poumon (314 - Mead 1967). Un volume courant largement supérieur suggère que rat 0E montrait un grade d'emphysème important.

### B.1.5 Mesure de $R_2^*$

Les  $R_2^*$  pré- et post-contraste du rat 0E étaient similaire à celui du rat 0EC et une augmentation de  $R_2^*$  après administration a été observée. La mesure pourrait être biaisée par le faible RSB avec cette sonde RF. Zurek *et al.* (315 - Zurek 2012) ont observés une décroissance de  $T_2^*$  (augmentation de  $R_2^*$ ) chez des rats emphysémateux à partir de 3 semaines post-instillation à l'élastase.

### B.1.6 Evolution de la cinétique de prise de contraste

Le rat contrôle 0EC avait un RSE ~50% juste après la fin de l'administration de l'aérosol ; le rat emphysémateux 0E avait un RSE maximal moins élevé et une durée plus longue pour y arriver, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les particules d'aérosol avaient plus de difficulté à être déposées sur les parois des alvéoles et des voies aériennes à cause de la destruction de ces parois. Malgré la différence de RSE maximal, ils montraient la même tendance : une augmentation rapide suivie par une décroissance progressive.

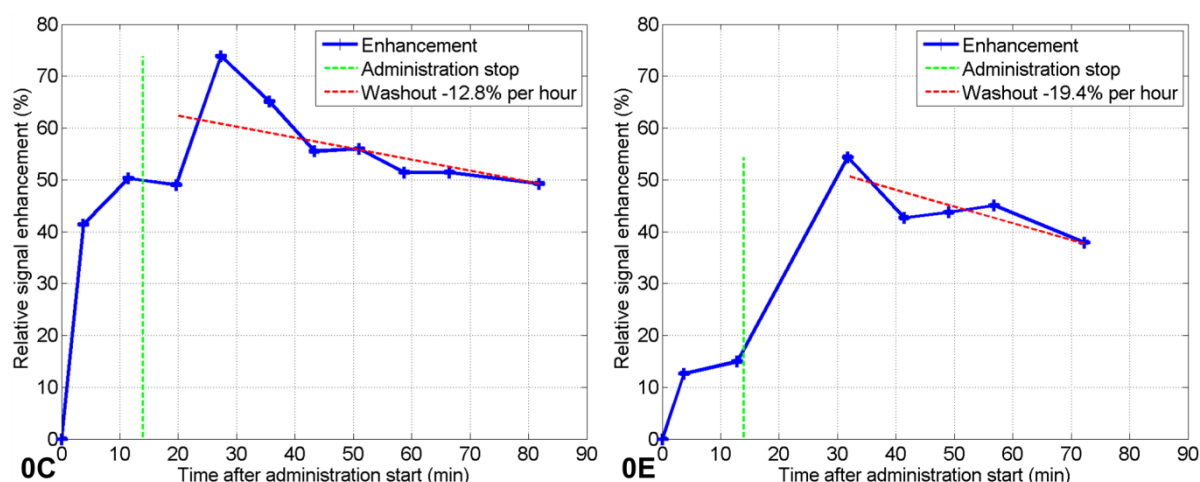


Figure B.1. Evolution de cinétique d'élimination du contraste en fonction du temps après l'administration d'aérosol respectivement pour le rat sain 0EC et le rat traité à l'élastase 0E. La courbe pour le rat 0E a une tendance similaire que celle du rat 0EC.

### B.1.7 Concentration des dépôts

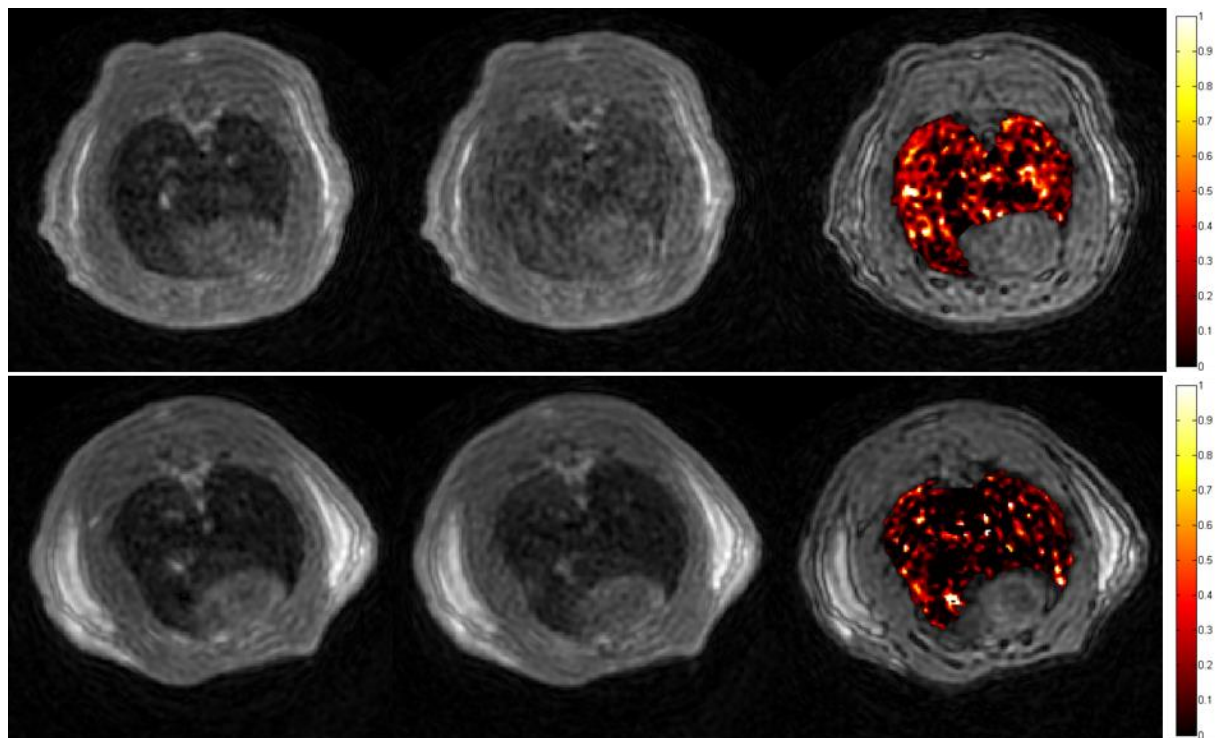


Figure B.2. Pré- (a), post- administration (à la fin de la nébulisation, b) et cartes de concentration de dépôt (c ; mmol/L) chez les rats contrôle 0EC et emphysémateux 0E. La barre de concentration est de 0 à 1 mmol/L. La concentration était plus élevée pour le rat 0EC en comparaison au rat 0E.

La Figure B.2 montre la carte de concentration du dépôt sur une coupe représentative du poumon de rat. Le rehaussement était relativement homogène chez rat contrôle 0EC ; tandis qu'un rehaussement plus faible pour le rat 0E a été observée. Cependant la concentration moyenne entre deux rats étaient comparables, 0,21 mM vs. 0,23 mM.

Le dépôt total d'aérosol calculé en considérant une fraction volumique de  $\sim 0,5$  donne une quantité  $\sim 15\%$  plus faible chez le rat emphysémateux ( $0,5 \mu\text{mol}$  vs.  $0,59 \mu\text{mol}$ ). En calculant la fraction de dépôt effective, cette différence est beaucoup plus remarquable ( $0,42\%$  vs.  $0,66\%$ ), indiquant que les particules administrés au rat emphysémateux était  $\sim 36\%$  plus faible. Cette observation est en accord avec celle de Sweeney *et al.* (304 - Sweeney 1987), qui avaient observé une quantité de dépôt plus faible chez les hamsters emphysémateux par rapport aux animaux sains.

## B.2 Micro-CT

La tomodensitométrie (CT : computed tomography) consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus. La radiodensité est ensuite donnée en unités de Hounsfield (UH), qui est défini comme :

$$UH = 1000 \times \frac{\mu_X - \mu_{eau}}{\mu_{eau}}, \quad (B.1)$$

où  $\mu_{eau}$  est le coefficient d'absorption linéaire de l'eau et  $\mu_X$  dénote le coefficient d'absorption moyen dans un voxel. La densité de l'air est fixée à -1000 UH et celle de l'eau à zéro UH. Ainsi, la densité des différents tissus, notamment du parenchyme pulmonaire peut être déterminée directement par l'équation (B.1).

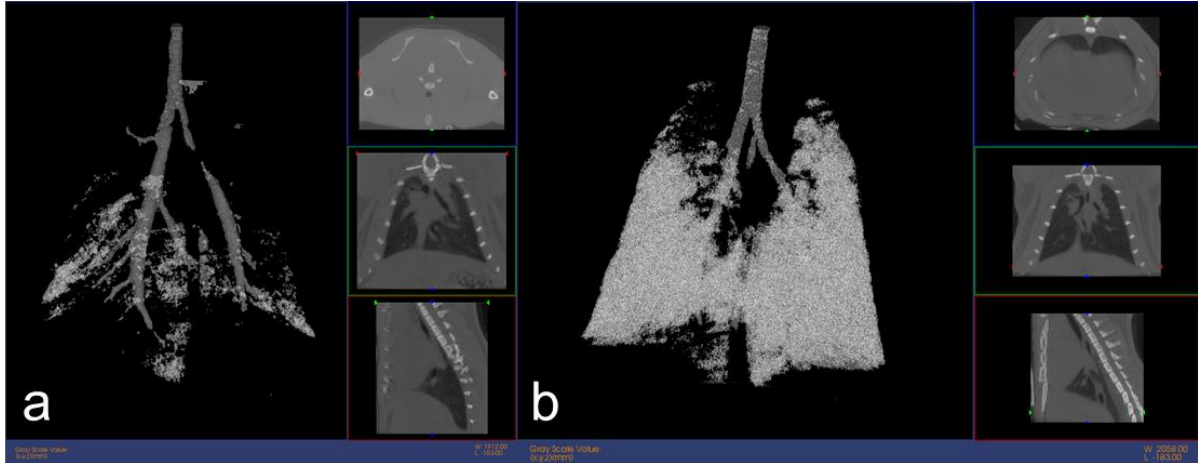


Figure B.3. Images obtenues par micro-tomodensitométrie sur le rat contrôlé 0EC (a) et emphysémateux 0E (b). Le rat 0E possédait un volume des zones pulmonaires de faible densité (proche de l'air) largement supérieur à celui du rat contrôlé (volume déterminé en niveau de gris donné, présenté par les zones blanches entourant les bronches).

Le scanner avait 70 kV de tension avec une intensité de 50 mA. Le temps d'exposition était de 16 ms. L'image a été acquise avec 1080 projections et binning 2x2 et a été reconstruite avec 50  $\mu$ m de résolution. L'acquisition était synchronisée sur l'inspiration et durait au total 35 à 45 min.

L'imagerie micro-CT a été analysée en mesurant le volume des zones de faible densité du poumon (316 - Kawakami 2008). Dans le cas de l'emphysème, une augmentation significative du volume correspondant à une densité proche de l'air dans la gamme de -800 à -600 UH peut être observée. Le volume des poumons était mesuré comme le volume des voxels ayant des niveaux de gris donnés correspondant à une faible densité (Figure B.3). Le volume était beaucoup plus grand pour le rat 0E par rapport au rat 0EC (0,58 mL vs. 0,21 mL), ce qui confirme l'atteinte significative par l'emphysème du rat 0E.

### B.3 Histologie

Les lésions caractéristiques de l'emphysème ont été évaluées par l'anapathologiste selon l'élargissement des espaces alvéolaires. En fonction de la présence de lésions, les poumons sont classés en 4 grades d'emphysème (Figure B.4), respectivement 0 non élargi ; 1 légèrement élargi ; 2 modérément élargi ; 3 notablement élargi. Le poumon emphysémateux montrait une hyper-distension de conduits alvéolaires, associée avec la rupture de septum alvéolaire. Les dilatations de l'espace

aérien distal est de plus en plus prononcé avec l'augmentation de grade d'emphysème.

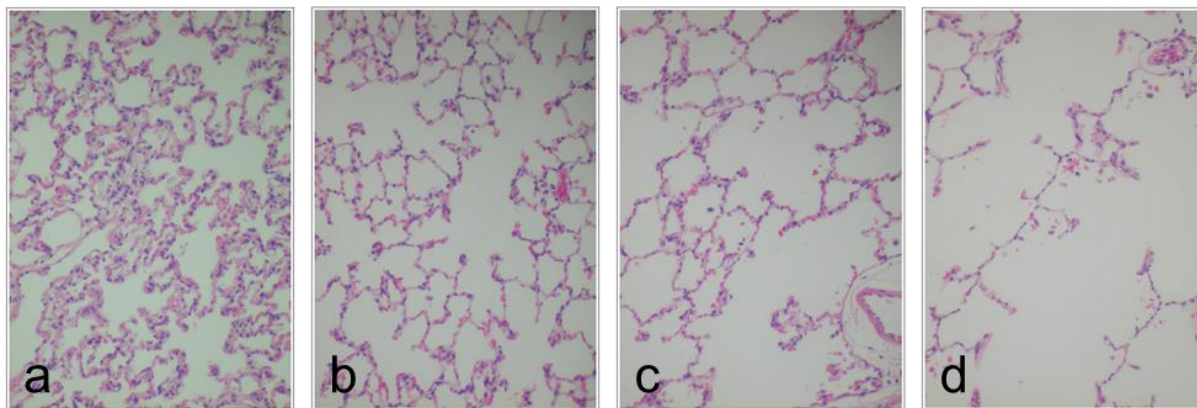


Figure B.4. Photomicrographie des échantillons de parenchyme pulmonaire de grade 0 (a), grade 1 (b), grade 2 (c) et grade 3 (d) déterminées par histologie. Le grade plus élevé correspond à la présence plus prononcée de l'élargissement de l'espace aérien distal à la bronchiole terminale.

L'analyse histologique a confirmé que le rat 0E avait une atteinte d'emphysème importante (Table B.2). Ses trois lobes analysés étaient tous très atteints par l'emphysème donnant un classement de grade 3. Cette observation histologique est à mettre au regard des résultats de l'IRM et du micro-CT.

	<b>Contrôle</b>	<b>Traité à l'élastase</b>
No. Animal	Rat 0EC	Rat 0E
Cotation de lobe droit crânien	1,0	3,0
Cotation de lobe droit caudal	0,0	2,0
Cotation de lobe gauche	0,0	3,0
Cotation moyenne d'emphysème (grade)	0	2,7

Table B.2. Les classements en grade d'emphysème pour les trois lobes examinés et classement moyen donnant le grade d'emphysème déterminé par l'analyse histologique pour les deux rats de mise en place de l'étude multimodale.

#### B.4 TEMP

La tomographie d'émission monophotonique (TEMP) permet d'acquérir une image fonctionnelle tridimensionnelle à l'aide d'un produit radiopharmaceutique administré qui se fixe ou s'accumule sur les organes ou les tissus à explorer. Pour l'imagerie du gaz krypton, un générateur est nécessaire. A l'intérieur de celui est présent du Rubidium-81 liquide qui se désintègre en Krypton-81m ( $^{81m}\text{Kr}$ ) gazeux. Le krypton, possédant une demi-vie de l'ordre de secondes, doit être donc ventilé en continu dans les poumons du rat. En pratique, un compresseur envoie de l'air dans le générateur pour faire sortir le krypton dans une tuyauterie reliée à une canule introduite dans la trachée du rat. L'animal, étendu sur le dos, respirait le krypton spontanément et l'acquisition de TEMP a été réalisée simultanément avec les paramètres suivants : résolution isotrope de 1,2 mm, 60 seconde par projection et au total ~20 min d'acquisition.

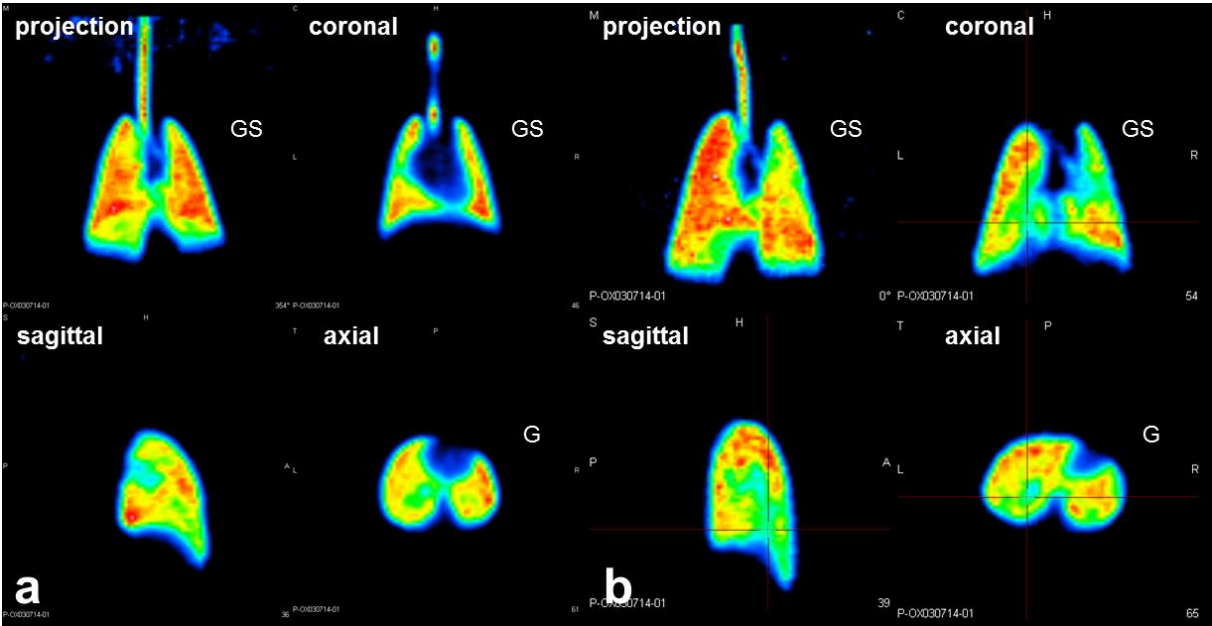


Figure B.5. Un exemple de l'image TEMP en  $^{81m}\text{Kr}$  du rat contrôle 2EC (a) et traité à l'élastase 11E (b), respectivement en projection, coronal, sagittal et axial. La région à l'intersection des lignes rouges (b) montre une zone moins ventilée. Qualitativement, la ventilation est moins homogène chez le rat traité à l'élastase 11E. Abréviation : GS = gauche supérieur, G = gauche.

L'imagerie de ventilation de  $^{81m}\text{Kr}$  gazeux a été acquise en 3D, avec un exemple montré respectivement en projection et les coupes coronal, sagittal et axial, pour le rat contrôle 2EC et le rat traité à l'élastase 11E (Figure B.5). Une distribution de ventilation moins homogène chez le rat 11E et une région basale moins bien ventilée (à l'intersection des lignes rouges) ont été observée.

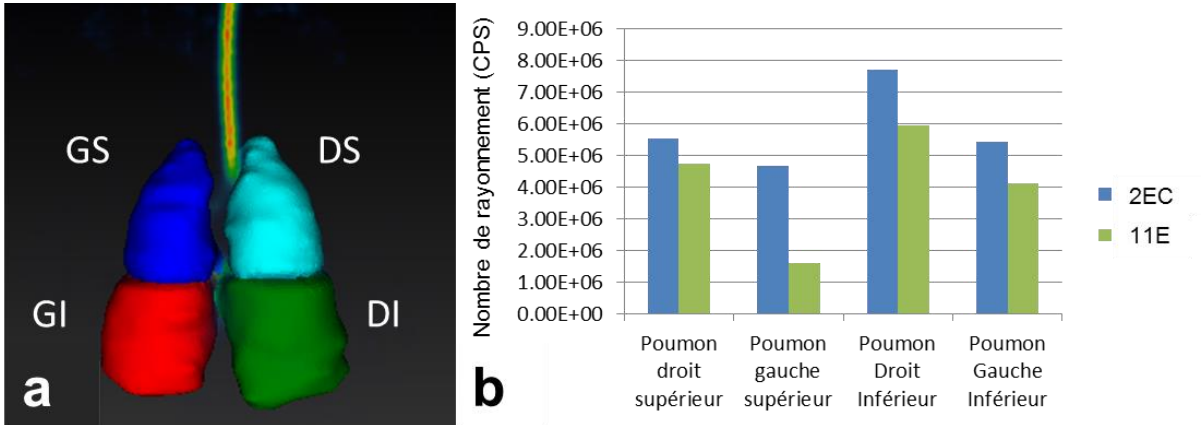


Figure B.6. Analyse de répartition de  $^{81m}\text{Kr}$  par région (a) et distribution du nombre de coups par seconde (CPS) par région chez le rat contrôle 2EC et traité à l'élastase 11E (b). Le rat 11E montre des CPS inférieurs au rat contrôle dans les 4 régions, en particulier avec une différence significative dans la région gauche supérieure. Abréviation : GS =gauche supérieur, DS = droit supérieur, GI = gauche inférieur, DI = droit inférieur, CPS = coups par seconde.

En mesurant le nombre de coups par seconde détectés, la distribution régionale du gaz radioactif peut être analysée quantitativement (Figure B.6). La division pulmonaire a été effectuée en balayant les

coupes axiales par inspection visuelle : le poumon droit et gauche pouvait être distingué facilement, alors que lorsque ces deux derniers se rejoignaient la région a été balayée du poumon supérieur au poumon inférieur. Comparé au rat contrôle 2EC, le nombre de coups par seconde dans les 4 régions chez le rat 11E étaient inférieurs indiquant moins de radioactivité globalement. La différence dans la région gauche supérieure était plus significative, suggérant que ce lobe était plus atteint par l'emphysème.

## **Symboles et abréviations**





## *Table des symboles*

$\alpha$	Angle de basculement
$\alpha_B$	Angle de Buxton
$\alpha_E$	Angle de Ernst
$\vec{B}_0, B_0$	Champ magnétique statique et son intensité
$\vec{B}_1, B_1$	Champ radiofréquence et son intensité
$BW$	Bande passante
$C$	Concentration de l'agent de contraste
$D, D_{12}, D_{11}$	Coefficient de diffusion général, coefficient de diffusion de deux gaz et d'un gaz pur (self-diffusion)
$d$	Diamètre moyen caractéristique
$d_{ae}$	Diamètre aérodynamique
$d_g$	Diamètre géométrique des particules
$d_M$	Diamètre massique équivalent des particules
$d_p$	Diamètre des atomes/molécules
$d_V$	Diamètre volumique équivalent des particules
$\Delta E$	Quantum d'énergie
$\phi$	Phase accumulée lors d'un codage
$\gamma$	Rapport gyromagnétique
$g$	Accélération due à la pesanteur
$G_r, G_p, G_s$	Gradient de lecture, gradient de codage de phase et gradient de sélection de coupe
$h, \hbar$	Constante de Planck, Constante de Planck normalisée
$\vec{H}$	Excitation magnétique imposée à la matière
$\vec{I}, I$	Moment cinétique intrinsèque, nombre de spin
$f_0$	Fréquence de résonance

$F_D$	Force de frottement sur la particule sphérique dans l'écoulement
$k_B$	Constante de Boltzmann
$J$	Flux de matière
$\vec{J}_n$	Moment cinétique du noyau
$\vec{k}, k_x, k_y, k_z$	Coordonnée dans le plan de Fourier
Kn	Nombre de Knudsen
$\lambda$	Libre parcours moyen
$L$	Longueur caractéristique
$\mu$	Viscosité dynamique du fluide
$\mu_0$	Perméabilité magnétique du vide
$L_C, Q_C, R_C$	Inductance de bobine, facteur de qualité, résistance de bobine
$\vec{M}, M_0$	Moment magnétique
$M$	Masse molaire de particule
$m$	Masse de particule
$m_p$	Masse de la particule
$\vec{m}_n$	Moment magnétique du noyau
$\nu$	Viscosité cinématique du fluide
$N$	Nombre de particules
$n_{\uparrow}, n_{\downarrow}, N_s$	Nombres de noyaux parallèle et antiparallèle, nombre de noyaux
$P$	Polarisation nucléaire
$p$	Pression hydrostatique externe (lors de la respiration)
$P_0$	Pression du gaz
$Pe$	Nombre Péclet
$p_v$	Pression de vapeur saturante
$Q$	Facteur de qualité d'une antenne
$\rho, \rho_m$	Masse volumique de matière
$\rho_0$	Masse volumique de l'eau (1 g/cm <sup>3</sup> )

---

$\bar{\rho}$	Densité de matière normalisée à l'eau.
$r$	Rayon caractéristique
$r_1$	Relaxivité longitudinale
$r_2$	Relaxivité transversale
$r_2^*$	Relaxivité transversale apparente
$R_1$	Taux de relaxation longitudinale
$R_2$	Taux de relaxation transversale
$R_2^*$	Taux de relaxation transversale apparente
$\sigma_m^2$	Variance du bruit
$S$	Signal RMN
$s$	Solubilité de matière dans l'eau
$s_{rms}$	Distance quadratique moyenne
$Stk$	Nombre de Stokes
$Re$	Nombre de Reynolds
RCB	Rapport contraste sur bruit
RSB	Rapport signal sur bruit
$\sigma$	Ecart-type
$\sigma_\phi$	Bruit de phase
$T$	Température
$T_1$	Temps de relaxation longitudinal
$T_2$	Temps de relaxation transversale
$T_2^*$	Temps de relaxation transversale apparente
$TE$	Temps d'écho
$TI$	Temps d'inversion
$TR$	Temps de répétition
$T_{acq}, T_{acq,eff}$	Temps d'acquisition, temps d'acquisition effectif
$T_{obs}$	Temps d'observation

$v_{rms}$	Vitesse quadratique moyenne
$n$	Densité du gaz (nombre)
$\vec{u}, \bar{u}$	Vélocité vectorielle, vélocité convective moyenne
$u_r$	Vitesse relative de la particule par rapport au gaz
$u_T$	Vitesse terminale (vitesse de chute de la particule)
$V$	Volume
$V_m$	Volume de matière
$V_p$	Volume de la particule
$x$	Facteur de géométrie dynamique
$\chi, \chi_m$	Susceptibilité magnétique volumique, susceptibilité molaire de l'agent de contraste
$\Upsilon$	Tension superficielle
$\omega_0$	Pulsation de Larmor
$\delta z$	Epaisseur de coupe

***Table des abréviations***

AM	Macrophage alvéolaire
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
bSSFP	Précession libre à l'état stationnaire ; balanced Steady State Free Precession
CI	Capacité inspiratoire
CMD	Diamètre médian sur le nombre ; Count Median Diameter
CPT	Capacité pulmonaire totale
CRF	Capacité résiduelle fonctionnelle
CV	Capacité vitale
CPMG	Carr Purcell Meiboom Gill
CRLB	Borne inférieure de Cramér-Rao ; Cramer-Rao Lower Bound
CT	Tomodensitométrie
DCE	Dynamic Contrast Enhanced
DPI	Inhalateurs de poudre
EBD	Evans blue dye
ET	Temps d'expiration
FLASH	Fast low angle shot
FID	Signal de précession libre ; Free Induction Decay
FOV	Champ de vue, Field-Of-View
FPD	Diffusion rapide des protons ; Fast Proton Diffusion
FT	Transformée de Fourier
Gd-DOTA	Gadoterate meglumine
GSD	Ecart-type géométrique ; Geometric standard deviation
HASTE	Half Fourier Acquisition Single Shot Turbo Spin Echo
HP	Hyperpolarisé
i. d.	Intradermique

IONP	Nanoparticules d'oxyde de fer ; Iron oxide nanoparticles
i.p.	Intrapéritonéal
IR	Inversion-Récupération
IRM	Imagerie de Résonance Magnétique
IT	Temps d'inspiration
i.v.	Intraveineux
MDI	Aérosols-doseurs avec gaz propulseur
MMAD	Diamètre aérodynamique médian sur la masse des particules ; Mass Median Aerodynamic Diameter
MMD	Diamètre médian sur la masse ; Mass Median Diamete
MV	Volume par minute
NIR	Imagerie proche infrarouge
OVA	Ovalbumine
PCA	Anaphylaxie cutanée passive
PEF	Débit maximal expiratoire ; Peak Expiratory Flow
PenH	Pause enhanced
PFC	Perfluorocarbones
PIF	Débit volumique maximale inspiratoire ; Peak Inspiratory Flow
PEF	Débit volumique maximal expiratoire ; Peak Expiratory Flow
PPE	Elastase Pancréatique Porcine
QSM	Quantitative Susceptibility Mapping
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROI	Région d'intérêt
RR	Fréquence respiratoire
RSE	Enhancement de signal relative
SPIO	SuperParamagnetic Iron Oxide

---

SI	Intensité de signal
SEM	Standard Error of Mean; Erreur type de la moyenne
SD	Ecart-type ; Standard Deviation
SR	Saturation-Récupération
RLC	Résistance, inductance, capacité
RSB	Rapport signal à bruit
TE	Temps d'écho
TEP	Tomographie par émission de positons
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TR	Temps de répétition
TTP	Temps pour atteindre le maximum de rehaussement ; Time-To-Peak
UH	Unité de Hounsfield
USPIO	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide
UTE	Temps d'écho ultra-court ; Ultra-short EchoTime
VC	Volume courant
VMD	Diamètre médian sur le volume ; Volume Median Diameter
VR	Volume résiduel
VRI, VRE	Volumes de réserve inspiratoires et expiratoires





# Publications associées à ce travail

## 1. Article dans des revues avec comité de lecture

- Wang H, Sébrié C, Ruaud J-P, Guillot G, Bouazizi-Verdier K, Willoquet G, Maître X, Darrasse L, and de Rochefort L, Aerosol Deposition in the Lungs of Spontaneously Breathing Rats Using Gd-DOTA-Based Contrast Agents and Ultra-Short Echo Time-MRI at 1.5 T, *Magnetic Resonance in Medicine (MRM)*, in press. DOI: 10.1002/mrm.25617

## 2. Communications avec actes

- Wang H, de Rochefort L, Raynaud J-S, Quantitative susceptibility mapping applied to functionalized iron oxide nanoparticles in an Alzheimer's disease model, *ESMRMB*, Lisbon, Portugal. Octobre, 2012.
- Wang H, Raynaud J-S, and de Rochefort L, Quantitative Susceptibility Mapping Reconstruction with Spatial Prior: Shortening Reconstruction Time and Choosing Regularization Parameters Automatically; *ISMRM 21th Annual Meeting*, Salt-Lake city, USA. Mai, 2013.
- Wang H, Maître X, Ruaud J-P, Darrasse L, and de Rochefort L. Measurement Precision of Contrast Agent with  $R2^*$  (Magnitude) and Quantitative Susceptibility Mapping (Phase), *ISMRM 21th Annual Meeting*, Salt-Lake city, USA. Mai, 2013.
- de Rochefort L, Wang H, Loureiro de Sousa P, and Armspach J-P, Efficient and Automatic Harmonic Field Pre-Filtering For Brain Quantitative Susceptibility Mapping, *ISMRM 21th Annual Meeting*, Salt-Lake city, USA. Mai, 2013.
- Hagot P, de Rochefort L, Ginefri J-C, Dubuisson R-M, Poirier-Quinot M, Ruaud J-P, Wang H, Maître X, and Darrasse L, Fluorinated gas MR imaging at ultra short echo time: Initial results on a 1.5 T clinical system. *ISMRM 21th Annual Meeting*, Salt-Lake city, USA. Mai, 2013.
- Wang H, Maître X, Ruaud J-P, Darrasse L, and de Rochefort L, Precision Limit of Contrast Agent with  $R2^*$  (Magnitude) and Quantitative Susceptibility Mapping (Phase), *2nd International Workshop on MRI Phase Contrast & Quantitative Susceptibility Mapping (QSM) conference proceeding*, Ithaca, USA. Juillet, 2013.
- Wang H, Sébrié C, Ruaud J-P, Guillot G, Bouazizi-Verdier K, Willoquet G, Maître X, Darrasse L, and de Rochefort L, Quantitative Gadolinium-based Aerosol Deposition and Dynamics in Healthy Rat Lung by UTE-MRI, *ISMRM-ESMRMB 22th Annual Meeting*, Milan, Italy. Mai, 2014.

- Wang H, Sebrié C, Judé S, Maurin A, Rétif S, Le Mée M, Dubuisson R-M, Willoquet G, Bouazizi-Verdier K, Darrasse L, Guillot G, Maître X, and de Rochefort L, Quantitative Gd-DOTA-based Aerosol Deposition in Asthmatic and Emphysematous Rats using UTE-MRI, *ISMRM 23th Annual Meeting*, Toronto, Ontario, Canada, Mai, 2015.
- Khalifé M, Wang H, Qiu L, Sebrié C, and de Rochefort L, Dual-nuclei  $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$  MRI for studying administration and clearance of perfluorooctane in rat lungs, *ISMRM 23th Annual Meeting*, Toronto, Ontario, Canada, Mai, 2015.

### 3. Communications sans actes

- Wang H, Maître X, Darrasse L, and de Rochefort L. Quantitative imaging of aerosol deposition in the airways of small animals using hyperpolarized helium-3 MRI, *Journée des doctorants I2BM*, Orsay, France. Juin, 2012.
- Wang H, Sébrié C, Ruaud J-P, Guillot G, Bouazizi-Verdier K, Willoquet G, Maître X, Darrasse L, and de Rochefort L, Quantitative Gadolinium-based Aerosol Deposition and Dynamics in Healthy Rat Lung by Ultrashort Echo Time Magnetic Resonance Imaging (MRI), *Journée de Dynamique des Fluides sur le Plateau de Saclay (JDFP)*, Orsay, France. Février, 2014.
- Wang H, de Rochefort L, Sébrié C, Guillot G, Maître X, Darrasse L, Imagerie quantitative du dépôt d'aérosols dans les voies aériennes du petit animal par résonance magnétique, *22e Colloque Jeunes Chercheurs en Physique Alain BOUYSSY*, Orsay, France. Février, 2014.

## **Bibliographie**



## Références par ordre d'apparition

1. Rabi, II, Zacharias JR, Millman S, Kusch P. *Milestones in magnetic resonance: 'a new method of measuring nuclear magnetic moment'*. 1938. J Magn Reson Imaging 1992;2:131-133.
2. Bloch F. *Nuclear Induction*. Physical Review 1946;70:460-474.
3. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. *Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid*. Physical Review 1946;69:37-38.
4. Lauterbur PC. *Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance*. 1973. Clinical orthopaedics and related research 1989;3-6.
5. Kumar A, Welti D, Ernst RR. *NMR Fourier zeugmatography*. 1975. J Magn Reson 2011;213:495-509.
6. Mansfield P, Maudsley AA. *Medical imaging by NMR*. The British journal of radiology 1977;50:188-194.
7. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. *The Feynman Lectures on Physics: Quantum Mechanics*. Boston: Addison-Wesley; 1963.
8. Mugler JP, 3rd, Altes TA. *Hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$  MRI of the human lung*. J Magn Reson Imaging 2013;37:313-331.
9. Décorps M. *Imagerie de résonance magnétique: Bases physiques et méthodes*: EDP Sciences; 2011.
10. Moller HE, Chen XJ, Saam B, Hagspiel KD, Johnson GA, Altes TA, de Lange EE, Kauczor HU. *MRI of the lungs using hyperpolarized noble gases*. Magn Reson Med 2002;47:1029-1051.
11. Haacke EM, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*: Wiley-Liss; 1999.
12. Bernstein M, King K, Zhou X. *Handbook of MRI Pulse Sequences*: Academic Press; 2004.
13. Hoult DI, Lauterbur PC. *The sensitivity of the zeugmatographic experiment involving human samples*. Journal of Magnetic Resonance (1969) 1979;34:425-433.
14. Macovski A. *Noise in MRI*. Magn Reson Med 1996;36:494-497.
15. Andersen AH. *On the Rician distribution of noisy MRI data*. Magnetic Resonance in Medicine 1996;36:331-332.
16. Fullerton GD, Potter JL, Dornbluth NC. *NMR relaxation of protons in tissues and other macromolecular water solutions*. Magn Reson Imaging 1982;1:209-226.
17. Bloembergen N, Purcell EM, Pound RV. *Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption*. Physical Review 1948;73:679-712.
18. Buxton RB, Edelman RR, Rosen BR, Wismer GL, Brady TJ. *Contrast in rapid MR imaging:  $T_1$ - and  $T_2$ -weighted imaging*. Journal of computer assisted tomography 1987;11:7-16.
19. Crawley AP, Henkelman RM. *A comparison of one-shot and recovery methods in  $T_1$  imaging*. Magnetic Resonance in Medicine 1988;7:23-34.
20. Fram EK, Herfkens RJ, Johnson GA, Glover GH, Karis JP, Shimakawa A, Perkins TG, Pelc NJ. *Rapid calculation of  $T_1$  using variable flip angle gradient refocused imaging*. Magn Reson Imaging 1987;5:201-208.
21. Cheng HL, Wright GA. *Rapid high-resolution  $T_1$  mapping by variable flip angles: accurate and precise measurements in the presence of radiofrequency field inhomogeneity*. Magn Reson Med 2006;55:566-574.
22. Chavhan GB, Babyn PS, Thomas B, Shroff MM, Haacke EM. *Principles, techniques, and applications of  $T_2^*$ -based MR imaging and its special applications*. Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc 2009;29:1433-1449.
23. Jung CW, Jacobs P. *Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil*. Magn Reson Imaging 1995;13:661-674.
24. Jackson JD. *Classical electrodynamics*. 3rd edition ed; 1999. p 808.
25. Conturo TE, Smith GD. *Signal-to-noise in phase angle reconstruction: dynamic range extension using phase reference offsets*. Magn Reson Med 1990;15:420-437.
26. de Rochefort L, Liu T, Kressler B, Liu J, Spincemaille P, Lebon V, Wu J, Wang Y. *Quantitative susceptibility map reconstruction from MR phase data using bayesian regularization: validation and application to brain imaging*. Magn Reson Med 2010;63:194-206.
27. de Rochefort L, Brown R, Prince MR, Wang Y. *Quantitative MR susceptibility mapping using piece-wise constant regularized inversion of the magnetic field*. Magn Reson Med 2008;60:1003-1009.

28. Sharma P, Brown SC, Walter G, Santra S, Scott E, Ichikawa H, Fukumori Y, Moudgil BM. *Gd nanoparticulates: from magnetic resonance imaging to neutron capture therapy*. Advanced Powder Technology 2007;18:663-698.
29. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann H-J. *Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strengths*. Investigative radiology 2005;40:715-724.
30. Port M, Idee JM, Medina C, Robic C, Sabatou M, Corot C. *Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine 2008;21:469-490.
31. de Rochefort L, Nguyen T, Brown R, Spincemaille P, Choi G, Weinsaft J, Prince MR, Wang Y. *In vivo quantification of contrast agent concentration using the induced magnetic field for time-resolved arterial input function measurement with MRI*. Med Phys 2008;35:5328-5339.
32. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M. *Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging*. Adv Drug Deliv Rev 2006;58:1471-1504.
33. Girard OM, Du J, Agemy L, Sugahara KN, Kotamraju VR, Ruoslahti E, Bydder GM, Mattrey RF. *Optimization of iron oxide nanoparticle detection using ultrashort echo time pulse sequences: comparison of T1, T2\*, and synergistic T1- T2\* contrast mechanisms*. Magn Reson Med 2011;65:1649-1660.
34. Wild JM, Marshall H, Bock M, Schad LR, Jakob PM, Puderbach M, Molinari F, Van Beek EJ, Biederer J. *MRI of the lung (1/3): methods*. Insights into imaging 2012;3:345-353.
35. El-Khatib E, Lehnert S. *Lung density changes observed in vivo in rat lungs after irradiation: Variations among and within individual lungs*. International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics 1989;16:745-754.
36. Olsson LE, Lindahl M, Onnervik PO, Johansson LB, Palmer M, Reimer MK, Hultin L, Hockings PD. *Measurement of MR signal and T2\* in lung to characterize a tight skin mouse model of emphysema using single-point imaging*. J Magn Reson Imaging 2007;25:488-494.
37. Cuttillo AG. *The clinical assessment of lung water*. Chest 1987;92:319-325.
38. Alsop DC, Hatabu H, Bonnet M, Listerud J, Geftter W. *Multi-slice, breathhold imaging of the lung with submillisecond echo times*. Magn Reson Med 1995;33:678-682.
39. Yu J, Xue Y, Song HK. *Comparison of lung T2\* during free-breathing at 1.5 T and 3.0 T with ultrashort echo time imaging*. Magn Reson Med 2011;66:248-254.
40. Cuttillo AG, Ailion DC. *Modeling the nuclear magnetic resonance behavior of lung: From electrical engineering to critical care medicine*. Bioelectromagnetics 1999;110-119.
41. Case TA, Durney CH, Ailion DC, Cuttillo AG, Morris AH. *A Mathematical-Model of Diamagnetic Line Broadening in Lung-Tissue and Similar Heterogeneous Systems - Calculations and Measurements*. Journal of Magnetic Resonance 1987;73:304-314.
42. Rajaram S, Swift AJ, Capener D, et al. *Lung morphology assessment with balanced steady-state free precession MR imaging compared with CT*. Radiology 2012;263:569-577.
43. Bieri O. *Ultra-fast steady state free precession and its application to in vivo H-1 morphological and functional lung imaging at 1.5 tesla*. Magnetic Resonance in Medicine 2013;70:657-663.
44. Bauman G, Puderbach M, Deimling M, Jellus V, Chef'd'hotel C, Dinkel J, Hintze C, Kauczor HU, Schad LR. *Non-contrast-enhanced perfusion and ventilation assessment of the human lung by means of fourier decomposition in proton MRI*. Magn Reson Med 2009;62:656-664.
45. Hatabu H, Gaa J, Tadamura E, Edinburgh KJ, Stock KW, Garpestad E, Edelman RR. *MR imaging of pulmonary parenchyma with a half-Fourier single-shot turbo spin-echo (HASTE) sequence*. European journal of radiology 1999;29:152-159.
46. Vogt FM, Herborn CU, Hunold P, Lauenstein TC, Schroder T, Debatin JF, Barkhausen J. *HASTE MRI versus chest radiography in the detection of pulmonary nodules: comparison with MDCT*. AJR Am J Roentgenol 2004;183:71-78.
47. Edelman RR, Hatabu H, Tadamura E, Li W, Prasad PV. *Noninvasive assessment of regional ventilation in the human lung using oxygen-enhanced magnetic resonance imaging*. Nature medicine 1996;2:1236-1239.
48. Look DC, Locker DR. *Time Saving in Measurement of NMR and EPR Relaxation Times*. Review of Scientific Instruments 1970;41:250-251.
49. Jakob PM, Hillenbrand CM, Wang T, Schultz G, Hahn D, Haase A. *Rapid quantitative lung (1)H T(1)*

- mapping. *J Magn Reson Imaging* 2001;14:795-799.
50. Bergin CJ, Pauly JM, Macovski A. *Lung parenchyma: projection reconstruction MR imaging*. *Radiology* 1991;179:777-781.
51. Robson MD, Gatehouse PD, Bydder M, Bydder GM. *Magnetic resonance: an introduction to ultrashort TE (UTE) imaging*. *Journal of computer assisted tomography* 2003;27:825-846.
52. Goodson BM. *Nuclear magnetic resonance of laser-polarized noble gases in molecules, materials, and organisms*. *J Magn Reson* 2002;155:157-216.
53. Beckmann N, Cannet C, Karmouty-Quintana H, Tigani B, Zurbrugg S, Ble FX, Cremillieux Y, Trifilieff A. *Lung MRI for experimental drug research*. *European journal of radiology* 2007;64:381-396.
54. Kauczor HU, Altes TA. *MRI of the Lung*: Springer; 2009.
55. Wild JM, Marshall H, Xu X, Norquay G, Parnell SR, Clemence M, Griffiths PD, Parra-Robles J. *Simultaneous imaging of lung structure and function with triple-nuclear hybrid MR imaging*. *Radiology* 2013;267:251-255.
56. Albert MS, Cates GD, Driehuys B, Happer W, Saam B, Springer CS, Jr., Wishnia A. *Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized <sup>129</sup>Xe*. *Nature* 1994;370:199-201.
57. Middleton H, Black RD, Saam B, et al. *MR imaging with hyperpolarized <sup>3</sup>He gas*. *Magn Reson Med* 1995;33:271-275.
58. Woodhouse N, Wild JM, Paley MN, Fichelle S, Said Z, Swift AJ, van Beek EJ. *Combined helium-3/proton magnetic resonance imaging measurement of ventilated lung volumes in smokers compared to never-smokers*. *J Magn Reson Imaging* 2005;21:365-369.
59. Ruiz-Cabello J, Barnett BP, Bottomley PA, Bulte JW. *Fluorine (<sup>19</sup>F) MRS and MRI in biomedicine*. *NMR Biomed* 2011;24:114-129.
60. Couch MJ, Ball IK, Li T, Fox MS, Littlefield SL, Biman B, Albert MS. *Pulmonary ultrashort echo time <sup>19</sup>F MR imaging with inhaled fluorinated gas mixtures in healthy volunteers: feasibility*. *Radiology* 2013;269:903-909.
61. Kuethle DO, Caprihan A, Fukushima E, Waggoner RA. *Imaging lungs using inert fluorinated gases*. *Magn Reson Med* 1998;39:85-88.
62. Schreiber WG, Eberle B, Laukemper-Ostendorf S, et al. *Dynamic (<sup>19</sup>F)-MRI of pulmonary ventilation using sulfur hexafluoride (<sup>32</sup>SF<sub>6</sub>) gas*. *Magn Reson Med* 2001;45:605-613.
63. Perez-Sanchez JM, Perez de Alejo R, Rodriguez I, Cortijo M, Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J. *In vivo diffusion weighted <sup>19</sup>F MRI using SF<sub>6</sub>*. *Magn Reson Med* 2005;54:460-463.
64. Ruiz-Cabello J, Perez-Sanchez JM, Perez de Alejo R, Rodriguez I, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G, Cortijo M. *Diffusion-weighted <sup>19</sup>F-MRI of lung periphery: Influence of pressure and air-SF<sub>6</sub> composition on apparent diffusion coefficients*. *Respiratory physiology & neurobiology* 2005;148:43-56.
65. Wolf U, Scholz A, Heussel CP, Markstaller K, Schreiber WG. *Subsecond fluorine-19 MRI of the lung*. *Magnetic Resonance in Medicine* 2006;55:948-951.
66. Festing M, Staats J. *STANDARDIZED NOMENCLATURE FOR INBRED STRAINS OF RATS: Fourth Listing*. *Transplantation* 1973;16:221-245.
67. Zimmermann F, Weiss J, Reifenberg K. *Chapter 10 - Breeding and Assisted Reproduction Techniques*. In: Krinke GJ, editor. *The Laboratory Rat*. London: Academic Press; 2000. p 177-198.
68. Gill III TJ, Nomura T, Festing MFW, Günther E, Kunz HW, Moriwaki K, Natori T. *Definition, Nomenclature, and Conservation of Rat Strains*: Committee on Rat Nomenclature; 1992 January 1, 1992. S1-S26 p.
69. Rubio ML, Sanchez-Cifuentes MV, Peces-Barba G, Verbanck S, Paiva M, Gonzalez Mangado N. *Intrapulmonary gas mixing in panacinar- and centriacinar-induced emphysema in rats*. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998;157:237-245.
70. Li M, Shang YX, Wei B, Yang YG. *The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro*. *Journal of inflammation (London, England)* 2011;8:18.
71. Carey MA, Card JW, Voltz JW, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC. *The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies*. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007;293:L272-278.
72. Schenk MP, Smith DG. *Dissection Guide & Atlas to the Rat*. Morton Publishing Company; 2001.
73. Gross EA, Swenberg JA, Fields S, Popp JA. *Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice*. *Journal of anatomy* 1982;135:83-88.

74. Morgan KT, Kimbell JS, Monticello TM, Patra AL, Fleishman A. *Studies of inspiratory airflow patterns in the nasal passages of the F344 rat and rhesus monkey using nasal molds: relevance to formaldehyde toxicity*. Toxicology and applied pharmacology 1991;110:223-240.
75. Phalen RF, Mendez LB. *Dosimetry considerations for animal aerosol inhalation studies*. Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals 2009;14 Suppl 1:63-66.
76. Schreider JP, Raabe OG. *Anatomy of the nasal-pharyngeal airway of experimental animals*. The Anatomical record 1981;200:195-205.
77. Schulz H, Muhle H. *Chapter 16 - Respiration*. In: Krinke GJ, editor. The Laboratory Rat. London: Academic Press; 2000. p 323-344.
78. Mercer RR, Russell ML, Roggli VL, Crapo JD. *Cell number and distribution in human and rat airways*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 1994;10:613-624.
79. Alexander I, Ritchie BC, Maloney JE, Hunter CR. *Epithelial surfaces of the trachea and principal bronchi in the rat*. Thorax 1975;30:171-177.
80. Yeh HC, Schum GM, Duggan MT. *Anatomic models of the tracheobronchial and pulmonary regions of the rat*. The Anatomical record 1979;195:483-492.
81. Weibel ER. *Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 1963;12:131-155.
82. Lee D, Srirama PK, Wallis C, Wexler AS. *Postnatal growth of tracheobronchial airways of Sprague-Dawley rats*. Journal of anatomy 2011;218:717-725.
83. Dormans JA, van Bree L, Boere AJ, Marra M, Rombout PJ. *Study of the effects of ozone in emphysematous rats*. Journal of toxicology and environmental health 1989;26:1-18.
84. De Backer JW, Vos WG, Burnell P, Verhulst SL, Salmon P, De Clerck N, De Backer W. *Study of the variability in upper and lower airway morphology in Sprague-Dawley rats using modern micro-CT scan-based segmentation techniques*. Anat Rec (Hoboken) 2009;292:720-727.
85. Schum M, Yeh HC. *Theoretical evaluation of aerosol deposition in anatomical models of mammalian lung airways*. Bulletin of mathematical biology 1980;42:1-15.
86. Lee D, Fanucchi MV, Plopper CG, Fung J, Wexler AS. *Pulmonary architecture in the conducting regions of six rats*. Anat Rec (Hoboken) 2008;291:916-926.
87. Raabe OG, Yeh HC, Schum GM, Phalen RF. *Tracheobronchial Geometry: Human, Dog, Rat, Hamster--a Compilation of Selected Data from the Project Respiratory Tract Deposition Models*. U.S. Energy Research and Development Administration, Division of Biomedical and Environmental Research; 1976.
88. Sera T, Fujioka H, Yokota H, Makinouchi A, Himeno R, Schroter RC, Tanishita K. *Three-dimensional visualization and morphometry of small airways from microfocal X-ray computed tomography*. Journal of biomechanics 2003;36:1587-1594.
89. Bowden DH. *The alveolar macrophage*. Environmental health perspectives 1984;55:327-341.
90. Dethloff LA, Lehnert BE. *Compartmental origin of pulmonary macrophages harvested from mechanically disrupted lung tissue*. Experimental lung research 1987;13:361-383.
91. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, Richter J, Gundersen HJ. *The number of alveoli in the human lung*. American journal of respiratory and critical care medicine 2004;169:120-124.
92. Haefeli-Bleuer B, Weibel ER. *Morphometry of the human pulmonary acinus*. The Anatomical record 1988;220:401-414.
93. Tawhai MH, Pullan AJ, Hunter PJ. *Generation of an Anatomically Based Three-Dimensional Model of the Conducting Airways*. Annals of biomedical engineering 2000;28:793-802.
94. McCunney RJ. *Particle Overload In The Rat Lung And Lung Cancer: Implications For Human Risk Assessment*. Taylor & Francis; 1996.
95. Wright JL, Sun JP, Vedal S. *A longitudinal analysis of pulmonary function in rats during a 12 month cigarette smoke exposure*. Eur Respir J 1997;10:1115-1119.
96. Yokoyama E. *Ventilatory functions of normal rats of different ages*. Comparative biochemistry and physiology A, Comparative physiology 1983;75:77-80.
97. Vandewalle H. *Consommation d'oxygène et consommation maximale d'oxygène : intérêts et limites de leur mesure*. Annales de Réadaptation et de Médecine Physique 2004;47:243-257.
98. Golshahi L, Finlay WH. *Recent Advances in Understanding Gas and Aerosol Transport in the Lungs: Application to Predictions of Regional Deposition*. In: Wang L, editor. Advances in Transport Phenomena. Volume 1, Advances in Transport Phenomena: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p 1-30.
99. Verbanck S, Paiva M. *Gas mixing in the airways and airspaces*. Compr Physiol 2011;1:809-834.



100. Hinds WC. *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*: Wiley; 2012.
101. Berg HC. *Random Walks in Biology*: Princeton University Press; 1993.
102. Poling BE, Prausnitz JM, O'Connell JP. *The Properties of Gases and Liquids*. Diffusion coefficients: McGraw-Hill; 2001. p 11.11 - 11.55.
103. Chang HK. *Diffusion of Gases*. Compr Physiol: John Wiley & Sons, Inc.; 2011.
104. Chang HK, Farhi LE. *Ternary diffusion and effective diffusion coefficients in alveolar spaces*. Respiration physiology 1980;40:269-279.
105. George SC, Hlastala MP. *Airway Gas Exchange and Exhaled Biomarkers*. Compr Physiol 2011;1:1837-1859.
106. Bird BR, Stewart WE, Lightfoot EN. *Transport Phenomena*. New York: John Wiley; 1994.
107. Scherer PW, Haselton FR. *Convective exchange in oscillatory flow through bronchial-tree models*. Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology 1982;53:1023-1033.
108. Boulet L, Belanger M, Carrier G. *Airway responsiveness and bronchial-wall thickness in asthma with or without fixed airflow obstruction*. American journal of respiratory and critical care medicine 1995;152:865-871.
109. Tulic MK, Christodoulopoulos P, Hamid Q. *Small airway inflammation in asthma*. Respiratory research 2001;2:333-339.
110. *Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007*. The Journal of allergy and clinical immunology 2007;120:S94-138.
111. Symposium. *Terminology, Definitions, and Classification of Chronic Pulmonary Emphysema and Related Conditions: A Report of the Conclusions of a Ciba Guest Symposium*; 1959. Report nr 0040-6376,1468-3296. 286-299 p.
112. Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, Bengali ZH. *The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop*; 1985 Jul. Report nr 0003-0805 (Print). 182-185 p.
113. Snider GL. *Protease-antiprotease imbalance in the pathogenesis of emphysema and chronic bronchial injury: A potential target for drug development*. Drug Development Research 1987;10:235-253.
114. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, et al. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. American journal of respiratory and critical care medicine 2013;187:347-365.
115. Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M, Timens W. *The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent*. Clin Exp Immunol 2002;129:390-396.
116. Liu S, Chihara K, Maeyama K. *The contribution of mast cells to the late-phase of allergic asthma in rats*. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al] 2005;54:221-228.
117. Misawa M, Takenouchi K, Abiru T, Yoshino Y, Yanaura S. *Strain difference in an allergic asthma model in rats*. Japanese journal of pharmacology 1987;45:63-68.
118. Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, Oettgen HC. *Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:1344-1349.
119. Fan M, Jamal Mustafa S. *Role of adenosine in airway inflammation in an allergic mouse model of asthma*. International immunopharmacology 2006;6:36-45.
120. Zosky GR, Sly PD. *Animal models of asthma*. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 2007;37:973-988.
121. Raza Asim MB, Shahzad M, Yang X, Sun Q, Zhang F, Han Y, Lu S. *Suppressive effects of black seed oil on ovalbumin induced acute lung remodeling in E3 rats*. Swiss Med Wkly 2010;140:w13128.
122. Di Petta A. *Histopathological characteristics of pulmonary emphysema in experimental model*. Einstein (Sao Paulo, Brazil) 2014;12:382-383.
123. Gross P, Bayak MA, Tolker E, Kaschak M. *Enzymatically Produced Pulmonary Emphysema: A preliminary report*. Journal of Occupational and Environmental Medicine 1964;6:481-484.
124. Snider GL. *Experimental studies on emphysema and chronic bronchial injury*. European journal of respiratory diseases Supplement 1986;146:17-35.
125. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. *The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase*. The American review of respiratory disease 1977;116:469-475.

126. Mahadeva R, Shapiro SD. *Chronic obstructive pulmonary disease \* 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema*. Thorax 2002;57:908-914.
127. Schmauss A. *Kolloidchemie und Meteorologie*. Kolloid-Zeitschrift 1922;31:266-269.
128. Mailliat A. *Les Milieux aérosols et leurs représentations*: EDP Sciences; 2012.
129. Boulaud D, A. R. *Physique des aérosols Partie 1*. Techniques de l'ingénieur États de la matière 2003;base documentaire : TIB109DUO.
130. Kleinstreuer C, Zhang Z, Donohue JF. *Targeted drug-aerosol delivery in the human respiratory system*. Annual review of biomedical engineering 2008;10:195-220.
131. Heyder J. *Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery*. Proceedings of the American Thoracic Society 2004;1:315-320.
132. Newman SP, Stockley RA, Rennard SI, Rabe K, Celli B. *Aerosols and Delivery Systems*. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Blackwell Publishing Ltd; 2008. p 481-498.
133. Kulkarni P, Baron PA, Willeke K. *Introduction to Aerosol Characterization*. Aerosol Measurement: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p 1-13.
134. DeCarlo PF, Slowik JG, Worsnop DR, Davidovits P, Jimenez JL. *Particle Morphology and Density Characterization by Combined Mobility and Aerodynamic Diameter Measurements. Part 1: Theory*. Aerosol Science and Technology 2004;38:1185-1205.
135. Kulkarni P, Baron PA, Willeke K. *Fundamentals of Single Particle Transport*. Aerosol Measurement: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p 15-30.
136. John W. *Size Distribution Characteristics of Aerosols*. Aerosol Measurement: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p 41-54.
137. Ramachandran G, Cooper DW. *Size Distribution Data Analysis and Presentation*. Aerosol Measurement: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p 479-506.
138. O'Callaghan C, Barry PW. *The science of nebulised drug delivery*. Thorax 1997;52 Suppl 2:S31-44.
139. Mitchell JP, Nagel MW, Nichols S, Nerbrink O. *Laser diffractometry as a technique for the rapid assessment of aerosol particle size from inhalers*. J Aerosol Med 2006;19:409-433.
140. Mitchell JP, Nagel MW. *Cascade impactors for the size characterization of aerosols from medical inhalers: their uses and limitations*. J Aerosol Med 2003;16:341-377.
141. Martin AR, Ang A, Katz IM, Haussermann S, Caillibotte G, Texereau J. *An in vitro assessment of aerosol delivery through patient breathing circuits used with medical air or a helium-oxygen mixture*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2011;24:225-234.
142. Holman JP. *Heat Transfer*. ed. t, editor: Dubuque, IA McGraw-Hill 2009; 2002.
143. Avila K, Moxey D, de Lozar A, Avila M, Barkley D, Hof B. *The Onset of Turbulence in Pipe Flow*. Science 2011;333:192-196.
144. Darquenne C. *Aerosol deposition in health and disease*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2012;25:140-147.
145. Frohlich E, Salar-Behzadi S. *Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies*. International journal of molecular sciences 2014;15:4795-4822.
146. Rubin BK, Fink JB. *The delivery of inhaled medication to the young child*. Pediatric clinics of North America 2003;50:717-731.
147. Heyder J, Gebhart J, Rudolf G, Schiller CF, Stahlhofen W. *Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15 µm*. J Aerosol Sci 1986;17:811-825.
148. Koblinger L, Hofmann W. *Aerosol Inhalation in the Rat Lung Part II: Theoretical Predictions of Particle Deposition Patterns*. Journal of Aerosol Medicine 1995;8:21-32.
149. Zhang J, Wu L, Chan HK, Watanabe W. *Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles*. Adv Drug Deliv Rev 2011;63:441-455.
150. Donovan MD, Zhou M. *Drug effects on in vivo nasal clearance in rats*. International journal of pharmaceuticals 1995;116:77-86.
151. Hussain M, Madl P, Khan A. *Lung deposition predicoids of airborne particles and the emergence of contemporary diseases Part-I*. theHealth 2011;2:51-59.
152. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. *Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans*. Circulation 2002;105:411-414.
153. Bailey MR, Ansoborlo E, Guilmette RA, Paquet F. *Updating the ICRP human respiratory tract model*. Radiation protection dosimetry 2007;127:31-34.
154. Patton JS, Fishburn CS, Weers JG. *The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery*.

- Proceedings of the American Thoracic Society 2004;1:338-344.
155. Olsson B, Bondesson E, Borgström L, Edsbäcker S, Eirefelt S, Ekelund K, Gustavsson L, Hegelund-Myrbäck T. *Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption*. In: Smyth HDC, Hickey AJ, editors. *Controlled Pulmonary Drug Delivery, Advances in Delivery Science and Technology*. Springer New York; 2011. p 21-50.
156. Rau JL. *The inhalation of drugs: advantages and problems*. Respiratory care 2005;50:367-382.
157. Fernández Tena A, Casan Clarà P. *Deposition of Inhaled Particles in the Lungs*. Archivos de Bronconeumología (English Version) 2012;48:240-246.
158. Mercer TT. *PRoduction and characterization of aerosols*. Archives of internal medicine 1973;131:39-50.
159. Newman SP. *A comparison of lung deposition patterns between different asthma inhalers*. J Aerosol Med 1995;8 Suppl 3:S21-26; discussion S27.
160. Aerogen. <http://www.aerogen.com/Vibronic.html>.
161. Zainudin BM, Biddiscombe M, Tolfree SE, Short M, Spiro SG. *Comparison of bronchodilator responses and deposition patterns of salbutamol inhaled from a pressurised metered dose inhaler, as a dry powder, and as a nebulised solution*. Thorax 1990;45:469-473.
162. Davis SS, Elson G, Whitmore J. *Physico-chemical studies on aerosol solutions for drug delivery II. Water-propylene glycol-ethanol systems*. International journal of pharmaceutics 1978;1:85-93.
163. Fathi Azarbayjani A, Jouyban A, Chan SY. *Impact of surface tension in pharmaceutical sciences*. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques 2009;12:218-228.
164. McCallion ONM, Taylor KMG, Thomas M, Taylor AJ. *Ultrasonic Nebulisation of Fluids with Different Viscosities and Surface Tensions*. Journal of Aerosol Medicine 1995;8:281-284.
165. Phipps PR, Gonda I. *Droplets produced by medical nebulizers. Some factors affecting their size and solute concentration*. Chest 1990;97:1327-1332.
166. Mosbah K, Ruiz-Cabello J, Berthezene Y, Cremillieux Y. *Aerosols and gaseous contrast agents for magnetic resonance imaging of the lung*. Contrast media & molecular imaging 2008;3:173-190.
167. Ryan G, Dolovich MB, Obminski G, Cockcroft DW, Juniper E, Hargreave FE, Newhouse MT. *Standardization of inhalation provocation tests: Influence of nebulizer output, particle size, and method of inhalation*. J Allergy Clin Immun 1981;67:156-161.
168. Merkus PJ, van Essen-Zandvliet EE, Parlevliet E, Borsboom G, Sterk PJ, Kerrebijn KF, Quanjer PH. *Changes of nebulizer output over the years*. Eur Respir J 1992;5:488-491.
169. Newman SP, Pavia D, Morén F, Sheahan NF, Clarke SW. *Deposition of pressurised aerosols in the human respiratory tract*. Thorax 1981;36:52-55.
170. Taburet AM, Schmit B. *Pharmacokinetic optimisation of asthma treatment*. Clinical pharmacokinetics 1994;26:396-418.
171. Muchao FP, Filho LV. *Advances in inhalation therapy in pediatrics*. Jornal de pediatria 2010;86:367-376.
172. Phalen RF. *Inhalation exposure of animals*. Environmental health perspectives 1976;16:17-24.
173. Leong BK, Coombs JK, Sabaitis CP, Rop DA, Aaron CS. *Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats*. Journal of applied toxicology : JAT 1998;18:149-160.
174. Lizio R, Westhof A, Lehr CM, Klenner T. *Oral endotracheal intubation of rats for intratracheal instillation and aerosol drug delivery*. Laboratory animals 2001;35:257-260.
175. Byron PR, Hindle M, Lange CF, et al. *In vivo-in vitro correlations: predicting pulmonary drug deposition from pharmaceutical aerosols*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2010;23 Suppl 2:S59-69.
176. Enna S, Schanker L. *Absorption of drugs from the rat lung*; 1972. 1227-1231 p.
177. Brain JD, Knudson DE, Sorokin SP, Davis MA. *Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation*. Environmental Research 1976;11:13-33.
178. Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB. *Intratracheal Instillation as an Exposure Technique for the Evaluation of Respiratory Tract Toxicity: Uses and Limitations*. Toxicological Sciences 2000;55:24-35.
179. Klockare M, Dufva A, Danielsson AM, Hatherly R, Larsson S, Jacobsson H, Mure M. *Comparison between direct humidification and nebulization of the respiratory tract at mechanical ventilation: distribution of saline solution studied by gamma camera*. Journal of clinical nursing 2006;15:301-307.

180. Osier M, Oberdorster G. *Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects*. Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology 1997;40:220-227.
181. Kardia E, Yusoff NM, Zakaria Z, Yahaya B. *Aerosol-based delivery of fibroblast cells for treatment of lung diseases*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2014;27:30-34.
182. Roller J, Laschke MW, Tschernig T, Schramm R, Veith NT, Thorlacius H, Menger MD. *How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung*. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine 2011;7:753-762.
183. Namati E, Chon D, Thiesse J, Hoffman EA, de Ryk J, Ross A, McLennan G. *In vivo micro-CT lung imaging via a computer-controlled intermittent iso-pressure breath hold (IIBH) technique*. Physics in medicine and biology 2006;51:6061-6075.
184. Aillon KL, El-Gendy N, Dennis C, Norenberg JP, McDonald J, Berkland C. *Iodinated NanoClusters as an inhaled computed tomography contrast agent for lung visualization*. Molecular pharmaceutics 2010;7:1274-1282.
185. El-Gendy N, Aillon KL, Berkland C. *Dry powdered aerosols of diatrizoic acid nanoparticle agglomerates as a lung contrast agent*. International journal of pharmaceutics 2010;391:305-312.
186. Bayat S, Dérugilliers L, Albu G, Porra L, Petak F, Strengell S, Suortti P, Sovijarvi A, Habre W. *Aerosol deposition during acute bronchoconstriction studied by synchrotron radiation imaging in rabbits*. European Respiratory Journal 2013;42:208.
187. Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM. *Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent*. The British journal of radiology 2006;79:248-253.
188. Möller W, Gibson N, Geiser M, et al. *Gold nanoparticle aerosols for rodent inhalation and translocation studies*. J Nanopart Res 2013;15:1-13.
189. de Kemp RA, Epstein FH, Catana C, Tsui BM, Ritman EL. *Small-animal molecular imaging methods*. J Nucl Med 2010;51 Suppl 1:18S-32S.
190. Debbage P, Jaschke W. *Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors*. Histochemistry and cell biology 2008;130:845-875.
191. Moller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, Haussinger K, Kreyling WG. *Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery*. American journal of respiratory and critical care medicine 2008;177:426-432.
192. Dolovich MB. *<sup>18</sup>F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomographic Imaging of Pulmonary Functions, Pathology, and Drug Delivery*. Proceedings of the American Thoracic Society 2009;6:477-485.
193. Moller W, Meyer G, Scheuch G, Kreyling WG, Bennett WD. *Left-to-right asymmetry of aerosol deposition after shallow bolus inhalation depends on lung ventilation*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2009;22:333-339.
194. Huchon GJ, Montgomery AB, Lipavsky A, Hoeffel JM, Murray JF. *Respiratory clearance of aerosolized radioactive solutes of varying molecular weight*. J Nucl Med 1987;28:894-902.
195. Bondesson E, Bengtsson T, Nilsson LE, Wollmer P. *Site of deposition and absorption of an inhaled hydrophilic solute*. British journal of clinical pharmacology 2007;63:722-731.
196. Eberl S, Chan HK, Daviskas E, Constable C, Young I. *Aerosol deposition and clearance measurement: a novel technique using dynamic SPET*. European journal of nuclear medicine 2001;28:1365-1372.
197. Fleming J, Conway J, Majoral C, et al. *The use of combined single photon emission computed tomography and X-ray computed tomography to assess the fate of inhaled aerosol*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2011;24:49-60.
198. Palko HA, Fung JY, Louie AY. *Positron emission tomography: a novel technique for investigating the biodistribution and transport of nanoparticles*. Inhalation toxicology 2010;22:657-688.
199. Saha GB, MacIntyre WJ, Go RT. *Cyclotrons and positron emission tomography radiopharmaceuticals for clinical imaging*. Seminars in nuclear medicine 1992;22:150-161.
200. Nahar K, Gupta N, Gauvin R, Absar S, Patel B, Gupta V, Khademhosseini A, Ahsan F. *In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals*. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences 2013;49:805-818.
201. le Masne de Chermont Q, Chaneac C, Seguin J, Pelle F, Maitrejean S, Jolivet JP, Gourrier D, Bessodes M, Scherman D. *Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging*. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:9266-9271.

202. Yi D, Price A, Panoskaltsis-Mortari A, Naqwi A, Wiedmann TS. *Measurement of the distribution of aerosols among mouse lobes by fluorescent imaging*. Analytical biochemistry 2010;403:88-93.
203. Adams KE, Ke S, Kwon S, et al. *Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer*. Journal of biomedical optics 2007;12:024017-024019.
204. Zintchenko A, Susha AS, Concia M, Feldmann J, Wagner E, Rogach AL, Ogris M. *Drug nanocarriers labeled with near-infrared-emitting quantum dots (quantoplexes): imaging fast dynamics of distribution in living animals*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 2009;17:1849-1856.
205. Montgomery AB, Paaanen H, Brasch RC, Murray JF. *Aerosolized gadolinium-DTPA enhances the magnetic resonance signal of extravascular lung water*. Investigative radiology 1987;22:377-381.
206. Berthezene Y, Vexler V, Clement O, Muhler A, Moseley ME, Brasch RC. *Contrast-enhanced MR imaging of the lung: assessments of ventilation and perfusion*. Radiology 1992;183:667-672.
207. Gobbo OL, Zurek M, Tewes F, Ehrhardt C, Cremillieux Y. *Manganese: a new contrast agent for lung imaging?* Contrast media & molecular imaging 2012;7:542-546.
208. Haage P, Karaagac S, Adam G, Glowinski A, Gunther RW. *Comparison of aerosolized gadoteridol and gadopentetate dimeglumine for magnetic resonance ventilation imaging of the lung*. Magn Reson Med 2001;46:803-806.
209. Suga K, Ogasawara N, Tsukuda T, Matsunaga N. *Assessment of regional lung ventilation in dog lungs with Gd-DTPA aerosol ventilation MR imaging*. Acta Radiol 2002;43:282-291.
210. Suga K, Yuan Y, Ogasawara N, Tsukuda T, Matsunaga N. *Altered clearance of gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid aerosol from bleomycin-injured dog lungs - Initial observations*. American journal of respiratory and critical care medicine 2003;167:1704-1710.
211. Hirsch W, Wenkel R, Eichler G, Paetzel V, Schluter A. *Pulmonary resorption of inhaled gadobutrol in an animal model: usage to determine lung diffusion in MRI examinations*. Magn Reson Imaging 2004;22:489-493.
212. Sood BG, Shen Y, Latif Z, Chen X, Sharp J, Neelavalli J, Joshi A, Slovis TL, Haacke EM. *Aerosol delivery in ventilated newborn pigs: an MRI evaluation*. Pediatric research 2008;64:159-164.
213. Martin AR, Thompson RB, Finlay WH. *MRI measurement of regional lung deposition in mice exposed nose-only to nebulized superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2008;21:335-342.
214. Sarraanie M, Martin A, Tardieu M, et al. *In vivo 3D mapping of aerosol deposition in rat lungs*. 2012; Melbourne, Australia. Proceedings of the 20th Annual Meeting of ISMRM. p 633.
215. Oakes JM, Scadeng M, Breen EC, Prisk GK, Darquenne C. *Regional distribution of aerosol deposition in rat lungs using magnetic resonance imaging*. Annals of biomedical engineering 2013;41:967-978.
216. Strobel K, Hoerr V, Schmid F, Wachsmuth L, Loffler B, Faber C. *Early detection of lung inflammation: exploiting T1-effects of iron oxide particles using UTE MRI*. Magn Reson Med 2012;68:1924-1931.
217. Bianchi A, Lux F, Tillement O, Crémillieux Y. *Contrast enhanced lung MRI in mice using ultra-short echo time radial imaging and intratracheally administrated Gd-DOTA-based nanoparticles*. Magnetic Resonance in Medicine 2013;70:1419-1426.
218. Roller J, Laschke MW, Tschernig T, Schramm R, Veith NT, Thorlacius H, Menger MD. *How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine;7:753-762.
219. Le Trequesser Q, Seznec H, Delville M-H. *Functionalized nanomaterials: their use as contrast agents in bioimaging: mono- and multimodal approaches*. Nanotechnology Reviews. Volume 2; 2013. p 125.
220. Bianchi A, Dufort S, Lux F, Courtois A, Tillement O, Coll JL, Cremillieux Y. *Quantitative biodistribution and pharmacokinetics of multimodal gadolinium-based nanoparticles for lungs using ultrashort TE MRI*. MAGMA 2014;27:303-316.
221. Beija M, Li Y, Duong HT, Laurent S, Elst LV, Muller RN, Lowe AB, Davis TP, Boyer C. *Polymer-gold nanohybrids with potential use in bimodal MRI/CT: enhancing the relaxometric properties of Gd(iii) complexes*. Journal of Materials Chemistry 2012;22:21382-21386.
222. Bur M, Henning A, Hein S, Schneider M, Lehr CM. *Inhalative nanomedicine--opportunities and challenges*. Inhalation toxicology 2009;21 Suppl 1:137-143.
223. Kircher MF, Willmann JK. *Molecular Body Imaging: MR Imaging, CT, and US. Part I. Principles*. Radiology 2012;263:633-643.
224. Kircher MF, Willmann JK. *Molecular Body Imaging: MR Imaging, CT, and US. Part II. Applications*.

- Radiology 2012;264:349-368.
225. Massoud TF, Gambhir SS. *Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light*. Genes & development 2003;17:545-580.
  226. Shmueli K, de Zwart JA, van Gelderen P, Li TQ, Dodd SJ, Duyn JH. *Magnetic susceptibility mapping of brain tissue in vivo using MRI phase data*. Magn Reson Med 2009;62:1510-1522.
  227. Weisskoff RM, Zuo CS, Boxerman JL, Rosen BR. *Microscopic susceptibility variation and transverse relaxation: theory and experiment*. Magn Reson Med 1994;31:601-610.
  228. Chu SC, Xu Y, Balschi JA, Springer CS, Jr. *Bulk magnetic susceptibility shifts in NMR studies of compartmentalized samples: use of paramagnetic reagents*. Magn Reson Med 1990;13:239-262.
  229. Marques JP, Bowtell R. *Application of a Fourier-based method for rapid calculation of field inhomogeneity due to spatial variation of magnetic susceptibility*. Concepts in Magnetic Resonance Part B: Magnetic Resonance Engineering 2005;25B:65-78.
  230. Hoffman RE. *Measurement of magnetic susceptibility and calculation of shape factor of NMR samples*. J Magn Reson 2006;178:237-247.
  231. Schweser F, Deistung A, Lehr BW, Reichenbach JR. *Quantitative imaging of intrinsic magnetic tissue properties using MRI signal phase: an approach to in vivo brain iron metabolism?* Neuroimage 2011;54:2789-2807.
  232. Björck Å. *4. Generalized Least Squares Problems*. Numerical Methods for Least Squares Problems; 1996. p 153-186.
  233. Raya JG, Dietrich O, Horng A, Weber J, Reiser MF, Glaser C. *T2 measurement in articular cartilage: impact of the fitting method on accuracy and precision at low SNR*. Magnetic Resonance in Medicine 2010;63:181-193.
  234. Lagarias J, Reeds J, Wright M, Wright P. *Convergence Properties of the Nelder--Mead Simplex Method in Low Dimensions*. SIAM Journal on Optimization 1998;9:112-147.
  235. Gill P, Murray W. *Algorithms for the Solution of the Nonlinear Least-Squares Problem*. SIAM Journal on Numerical Analysis 1978;15:977-992.
  236. Dahnke H, Schaeffter T. *Limits of detection of SPIO at 3.0 T using T-2\* relaxometry*. Magnetic Resonance in Medicine 2005;53.
  237. Peters AM, Brookes MJ, Hoogenraad FG, Gowland PA, Francis ST, Morris PG, Bowtell R. *T2\* measurements in human brain at 1.5, 3 and 7 T*. Magn Reson Imaging 2007;25:748-753.
  238. Schabel MC, Parker DL. *Uncertainty and bias in contrast concentration measurements using spoiled gradient echo pulse sequences*. Physics in medicine and biology 2008;53:2345-2373.
  239. Yablonskiy DA, Haacke EM. *Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime*. Magn Reson Med 1994;32:749-763.
  240. Rudiger M, Gregor T, Burkhardt W, Proquitte H, Wauer RR, Schmalisch G. *Perfluorocarbon species and nebulizer type influence aerosolization rate and particle size of perfluorocarbon aerosol*. Journal of critical care 2004;19:42-47.
  241. de Boer AH, Gjaltema D, Hagedoorn P, Frijlink HW. *Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique*. International journal of pharmaceutics 2002;249:219-231.
  242. Nicolas M, Pierre M. *Méthodes de prélèvement et d'analyse des aérosols*. Techniques de l'ingénieur Analyses dans l'environnement 2004;base documentaire : TIB382DUO.
  243. Denis B, Alain K. *Granulométrie des particules en mouvement et des aérosols*. Techniques de l'ingénieur Caractérisation des fluides 1995;base documentaire : TIB540DUO.
  244. Wong ST, Roos MS. *A strategy for sampling on a sphere applied to 3D selective RF pulse design*. Magn Reson Med 1994;32:778-784.
  245. Glover GH, Pauly JM, Bradshaw KM. *Boron-11 imaging with a three-dimensional reconstruction method*. Journal of Magnetic Resonance Imaging 1992;2:47-52.
  246. Muftuler LT, Gulsen G, Sezen KD, Nalcioğlu O. *Automatic tuned MRI RF coil for multinuclear imaging of small animals at 3T*. J Magn Reson 2002;155:39-44.
  247. Wild JM, Hersman FW, Patz S, Muradian I, Hrovat MI, Hatabu H, Butler JP, Schreiber WG, Dietrich O. *MRI of Pulmonary Ventilation*. In: Kauczor H-U, editor. MRI of the Lung, Medical Radiology: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p 35-90.
  248. Weibel ER, Sapoval B, Filoche M. *Design of peripheral airways for efficient gas exchange*. Respiratory physiology & neurobiology 2005;148:3-21.
  249. Murgia X, Gastiasoro E, Mielgo V, Alvarez-Diaz F, Lafuente H, Valls-i-Soler A, Gomez-Solaetxe MA,

- Larrabe JL, Rey-Santano C. *Surfactant and perfluorocarbon aerosolization by means of inhalation catheters for the treatment of respiratory distress syndrome: an in vitro study*. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery 2011;24:81-87.
250. Goikoetxea E, Murgia X, Serna-Grande P, et al. *In vitro surfactant and perfluorocarbon aerosol deposition in a neonatal physical model of the upper conducting airways*. PLoS One 2014;9:e106835.
  251. von der Hardt K, Schoof E, Kandler MA, Dotsch J, Rascher W. *Aerosolized perfluorocarbon suppresses early pulmonary inflammatory response in a surfactant-depleted piglet model*. Pediatric research 2002;51:177-182.
  252. Murgia X, Mielgo V, Valls-i-Soler A, Ruiz-del-Yerro E, Rey-Santano C. *Aerosolized perfluorocarbon improves gas exchange and pulmonary mechanics in preterm lambs with severe respiratory distress syndrome*. Pediatric research 2012;72:393-399.
  253. Garai J. *Physical model for vaporization*. Fluid Phase Equilibria 2009;283:89-92.
  254. Thomas SR, Gradon L, Pratsinis SE, Pratt RG, Fotou GP, McGoron AJ, Podgorski AL, Millard RW. *Perfluorocarbon compound aerosols for delivery to the lung as potential 19F magnetic resonance reporters of regional pulmonary pO<sub>2</sub>*. Investigative radiology 1997;32:29-38.
  255. Chenoune M, De Rochefort L, Bruneval P, et al. *Evaluation of lung recovery after static administration of three different perfluorocarbons in pigs*. BMC pharmacology & toxicology 2014;15:53.
  256. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. *Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm*. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological) 1977;39:1-38.
  257. Shioya S, Haida M, Fukuzaki M, Ono Y, Tsuda M, Ohta Y, Yamabayashi H. *A 1-year time course study of the relaxation times and histology for irradiated rat lungs*. Magn Reson Med 1990;14:358-368.
  258. Berthezene Y, Muhler A, Lang P, Shames DM, Clement O, Rosenau W, Kuwatsuru R, Brasch RC. *Safety aspects and pharmacokinetics of inhaled aerosolized gadolinium*. J Magn Reson Imaging 1993;3:125-130.
  259. Sotiras A, Davatzikos C, Paragios N. *Deformable medical image registration: a survey*. IEEE Trans Med Imaging 2013;32:1153-1190.
  260. Everard ML, Hardy JG, Milner AD. *Comparison of nebulised aerosol deposition in the lungs of healthy adults following oral and nasal inhalation*. Thorax 1993;48:1045-1046.
  261. Apiou-Sbirlea G, Katz IM, Martonen TB. *The effects of simulated airway diseases and affected flow distributions on aerosol deposition*. Respiratory care 2010;55:707-718.
  262. O'Doherty MJ, Peters AM. *Pulmonary technetium-99m diethylene triamine penta-acetic acid aerosol clearance as an index of lung injury*. European journal of nuclear medicine 1997;24:81-87.
  263. Donahue KM, Weisskoff RM, Burstein D. *Water diffusion and exchange as they influence contrast enhancement*. J Magn Reson Imaging 1997;7:102-110.
  264. Schlesinger RB, Gurman JL, Lippmann M. *Particle deposition within bronchial airways: comparisons using constant and cyclic inspiratory flows*. The Annals of occupational hygiene 1982;26:47-64.
  265. Martonen TB. *Deposition patterns of cigarette smoke in human airways*. American Industrial Hygiene Association journal 1992;53:6-18.
  266. Churg A, Vedal S. *Carinal and tubular airway particle concentrations in the large airways of non-smokers in the general population: evidence for high particle concentration at airway carinas*. Occupational and environmental medicine 1996;53:553-558.
  267. Balásházy I, Hofmann W, Heistracher T. *Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer*; 2003. 1719-1725 p.
  268. Oakes JM, Scadeng M, Breen EC, Marsden AL, Darquenne C. *Rat airway morphometry measured from in situ MRI-based geometric models*. J Appl Physiol 2012;112:1921-1931.
  269. Oakes JM, Marsden AL, Grandmont C, Shadden SC, Darquenne C, Vignon-Clementel IE. *Airflow and particle deposition simulations in health and emphysema: from in vivo to in silico animal experiments*. Annals of biomedical engineering 2014;42:899-914.
  270. Burgel PR, Nadel JA. *Plugging (publicising) to prevent mucous plugging*. Eur Respir J 2010;36:1236-1238.
  271. Averill DJ, Garcia J, Siriwardena-Mahanama BN, Vithanarachchi SM, Allen MJ. *Preparation, Purification, and Characterization of Lanthanide Complexes for Use as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging*. Journal of visualized experiments : JoVE 2011:2844.
  272. Baumann D, Rudin M. *Quantitative assessment of rat kidney function by measuring the clearance of the contrast agent Gd(DOTA) using dynamic MRI*. Magn Reson Imaging 2000;18:587-595.
  273. Vignaud A, Maître X, Guillot G, Durand E, de Rochefort L, Robert P, Vivès V, Santus R, Darrasse L.

- Magnetic susceptibility matching at the air-tissue interface in rat lung by using a superparamagnetic intravascular contrast agent: Influence on transverse relaxation time of hyperpolarized helium-3.* Magnetic Resonance in Medicine 2005;54:28-33.
274. Gossuin Y, Gillis P, Hocq A, Vuong QL, Roch A. *Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles.* Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology 2009;1:299-310.
  275. Takahashi M, Togao O, Obara M, et al. *Ultra-short echo time (UTE) MR imaging of the lung: comparison between normal and emphysematous lungs in mutant mice.* J Magn Reson Imaging 2010;32:326-333.
  276. Herborn CU, Honold E, Wolf M, Kemper J, Kinner S, Adam G, Barkhausen J. *Clinical safety and diagnostic value of the gadolinium chelate gadoterate meglumine (Gd-DOTA).* Investigative radiology 2007;42:58-62.
  277. Conolly S, Nishimura D, Macovski A, Glover G. *Variable-rate selective excitation.* Journal of Magnetic Resonance (1969) 1988;78:440-458.
  278. Capstick TG, Clifton IJ. *Inhaler technique and training in people with chronic obstructive pulmonary disease and asthma.* Expert review of respiratory medicine 2012;6:91-101; quiz 102-103.
  279. Braga F, Mota I. *Homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice and heterologous PCA induced in rats with mouse IgE.* Immunology 1976;30:655-669.
  280. Evans HM, Schulemann W. *The Action of Vital Stains Belonging to the Benzidine Group.* Science 1914;39:443-454.
  281. Chong BT, Agrawal DK, Romero FA, Townley RG. *Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: comparison of freely moving versus restrained guinea pigs.* Journal of pharmacological and toxicological methods 1998;39:163-168.
  282. Emami K, Cadman RV, Woodburn JM, et al. *Early changes of lung function and structure in an elastase model of emphysema--a hyperpolarized  $^3\text{He}$  MRI study.* J Appl Physiol (1985) 2008;104:773-786.
  283. Guoshen Y, Sapiro G, Mallat S. *Solving Inverse Problems With Piecewise Linear Estimators: From Gaussian Mixture Models to Structured Sparsity.* Image Processing, IEEE Transactions on 2012;21:2481-2499.
  284. Chen Q, Levin DL, Kim D, et al. *Pulmonary disorders: ventilation-perfusion MR imaging with animal models.* Radiology 1999;213:871-879.
  285. Dodge Y. *Coefficient of Skewness.* The Concise Encyclopedia of Statistics: Springer New York; 2008. p 92-95.
  286. Stadler A, Stiebellehner L, Jakob PM, Arnold JF, Eisenhuber E, von Katzler I, Bankier AA. *Quantitative and  $\text{o}(2)$  enhanced MRI of the pathologic lung: findings in emphysema, fibrosis, and cystic fibrosis.* International journal of biomedical imaging 2007;2007:23624.
  287. Stadler A, Jakob PM, Griswold M, Barth M, Bankier AA.  *$T_1$  mapping of the entire lung parenchyma: Influence of the respiratory phase in healthy individuals.* J Magn Reson Imaging 2005;21:759-764.
  288. Stadler A, Jakob PM, Griswold M, Stiebellehner L, Barth M, Bankier AA.  *$T_1$  mapping of the entire lung parenchyma: Influence of respiratory phase and correlation to lung function test results in patients with diffuse lung disease.* Magn Reson Med 2008;59:96-101.
  289. Conway J, Fleming J, Majoral C, et al. *Controlled, parametric, individualized, 2-D and 3-D imaging measurements of aerosol deposition in the respiratory tract of healthy human subjects for model validation.* J Aerosol Sci 2012;52:1-17.
  290. Bai TR, Knight DA. *Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences.* Clin Sci (Lond) 2005;108:463-477.
  291. Shifren A, Witt C, Christie C, Castro M. *Mechanisms of remodeling in asthmatic airways.* Journal of allergy 2012;2012:316049.
  292. Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Pare PD. *Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD.* J Appl Physiol (1985) 1993;74:2771-2781.
  293. Lutchen KR, Gillis H. *Relationship between heterogeneous changes in airway morphometry and lung resistance and elastance.* J Appl Physiol (1985) 1997;83:1192-1201.
  294. Martin JG, Dugué A, Eidelman DH. *The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease.* Eur Respir J 2000;16:349-354.
  295. Mitchell RW, Ruhlmann E, Magnusson H, Leff AR, Rabe KF. *Passive sensitization of human bronchi augments smooth muscle shortening velocity and capacity.* Am J Physiol 1994;267:L218-222.
  296. Rottier BL, Rubin BK. *Asthma medication delivery: mists and myths.* Paediatric respiratory reviews



- 2013;14:112-118; quiz 118, 137-118.
297. Hagler DA, Traver GA. *Endotracheal saline and suction catheters: sources of lower airway contamination*. American journal of critical care : an official publication, American Association of Critical-Care Nurses 1994;3:444-447.
298. Ackerman MH, Mick DJ. *Instillation of normal saline before suctioning in patients with pulmonary infections: a prospective randomized controlled trial*. American journal of critical care : an official publication, American Association of Critical-Care Nurses 1998;7:261-266.
299. Kinloch D. *Instillation of normal saline during endotracheal suctioning: effects on mixed venous oxygen saturation*. American journal of critical care : an official publication, American Association of Critical-Care Nurses 1999;8:231-240; quiz 241-232.
300. Freytag CC, Thies FL, König W, Welte T. *Prolonged application of closed in-line suction catheters increases microbial colonization of the lower respiratory tract and bacterial growth on catheter surface*. Infection 2003;31:31-37.
301. Marzola P, Lanzoni A, Nicolato E, Di Modugno V, Cristofori P, Osculati F, Sbarbati A. *(1)H MRI of pneumococcal pneumonia in a murine model*. J Magn Reson Imaging 2005;22:170-174.
302. Beckmann N, Tigani B, Ekatodramis D, Borer R, Mazzoni L, Fozard JR. *Pulmonary edema induced by allergen challenge in the rat: noninvasive assessment by magnetic resonance imaging*. Magn Reson Med 2001;45:88-95.
303. Conti G, Tambalo S, Villetti G, Catinella S, Carnini C, Bassani F, Sonato N, Sbarbati A, Marzola P. *Evaluation of lung inflammation induced by intratracheal administration of LPS in mice: comparison between MRI and histology*. MAGMA 2010;23:93-101.
304. Sweeney TD, Brain JD, Leavitt SA, Godleski JJ. *Emphysema alters the deposition pattern of inhaled particles in hamsters*. The American journal of pathology 1987;128:19-28.
305. Oakes JM, Breen EC, Scadeng M, Tchanchou GS, Darquenne C. *MRI-based measurements of aerosol deposition in the lung of healthy and elastase-treated rats*. J Appl Physiol (1985) 2014;116:1561-1568.
306. Damon EG, Mokler BV, Jones RK. *Influence of elastase-induced emphysema and the inhalation of an irritant aerosol on deposition and retention of an inhaled insoluble aerosol in Fischer-344 rats*. Toxicology and applied pharmacology 1983;67:322-330.
307. Kim CS, Kang TC. *Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease*. American journal of respiratory and critical care medicine 1997;155:899-905.
308. Hirschl RB, Pranikoff T, Gauger P, Schreiner RJ, Dechert R, Bartlett RH. *Liquid ventilation in adults, children, and full-term neonates*. Lancet 1995;346:1201-1202.
309. Clark LC, Jr., Gollan F. *Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure*. Science 1966;152:1755-1756.
310. Tissier R, Hamanaka K, Kuno A, Parker JC, Cohen MV, Downey JM. *Total liquid ventilation provides ultra-fast cardioprotective cooling*. J Am Coll Cardiol 2007;49:601-605.
311. Laukemper-Ostendorf S, Scholz A, Burger K, et al. *<sup>19</sup>F-MRI of perflubron for measurement of oxygen partial pressure in porcine lungs during partial liquid ventilation*. Magn Reson Med 2002;47:82-89.
312. Mills P, Sessler DI, Moseley M, Chew W, Pereira B, James TL, Litt L. *An in vivo <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance study of isoflurane elimination from the rabbit brain*. Anesthesiology 1987;67:169-173.
313. Emami K, Chia E, Kadlecsek S, MacDuffie-Woodburn JP, Zhu J, Pickup S, Blum A, Ishii M, Rizi RR. *Regional correlation of emphysematous changes in lung function and structure: a comparison between pulmonary function testing and hyperpolarized MRI metrics*; 2011. 225-235 p.
314. Mead J, Turner JM, Macklem PT, Little JB. *Significance of the relationship between lung recoil and maximum expiratory flow*; 1967. 95-108 p.
315. Zurek M, Boyer L, Caramelle P, Boczkowski J, Cremillieux Y. *Longitudinal and noninvasive assessment of emphysema evolution in a murine model using proton MRI*. Magn Reson Med 2012;68:898-904.
316. Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. *Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema*. Biological & pharmaceutical bulletin 2008;31:1434-1438.

